

**Molekulargenetische und biochemische Analyse der  
Biosynthese von  
2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin  
und seinem 5-Hydroxyderivat,  
zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten,  
in *Streptomyces chrysomallus***

vorgelegt von  
**Nicolas Grammel**  
- Diplom-Chemiker -

Vom Fachbereich 5 -Chemie-  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades  
**- Dr. rer. nat. -**  
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender:

Berichter: Priv.-Doz. Dr. U. Keller

Berichter: Prof. Dr. J. Salnikow

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2000

Berlin 1999

D 83

**Unser Wissen ist ein Tropfen.**

**Was wir nicht wissen, ist ein Ozean.**

***Isaac Newton***

# Zusammenfassung

Grammel, Nicolas

## Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*

Die Tetrahydropyrimidinderivate THP(B) (Ectoin) und THP(A) (Hydroxyectoin) zählen zu den wichtigsten intrazellulär gebildeten Osmolyten bei den halophilen Bakterien und den Streptomyceten. Eine Reihe von Arbeiten stellte einen Zusammenhang zwischen der THP-Biosynthese und der Salzstreßantwort in Streptomyceten her. Ein postulierter Weg der Biosynthese von THP(B) verläuft vom L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd über die L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) und N-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure. Durch Isolierung und Reinigung der DABA-Acetyltransferase wurde die Klonierung des THP-Biosynthesecuster in dem Actinomycin D produzierenden *Streptomyces chrysomallus* durch reverse Genetik ermöglicht. Die DABA-Acetyltransferase wurde in sieben Schritten partiell aus *S. chrysomallus* gereinigt. Dabei zeigte sich, daß die Bildung der DABA-Acetyltransferase durch einen Salzschock der Kultur induziert wurde. Das Gen der Acetyltransferase sowie die weiteren THP-Biosynthesegene wurden auf einem Cosmid, welches aus einer Cosmidgenbank genomischer *S. chrysomallus* DNA stammte, gefunden. Das identische Cosmid wurde durch Koloniehybridisierung mit einer synthetischen Oligonukleotidsonde, deren Sequenz von einer tryptischen Peptidsequenz der DABA-Acetyltransferase abgeleitet wurde, gefunden. Neben dem als *thpA* bezeichneten Gen, das für die DABA-Acetyltransferase (19,3 kDa) kodiert, wurden noch sieben weitere offene Leserahmen (ORF) gefunden, von denen die Gene *thpB*, *thpC* und *thpD*, die direkt nach dem *thpA* im 3'-Bereich folgen, in der THP-Biosynthese involviert sind. Die Expression von *thpA* in *E. coli* als Hexa-His-Fusionsprotein ergab ein Protein der erwarteten Größe, welches zur Homogenität gereinigt wurde. Die enzymatische Analyse ergab, daß das Protein die Acetylierung von DABA mit Acetyl-Coenzym A katalysiert. Bei Datenbankrecherchen zeigten *thpB* und *thpC* hohe Ähnlichkeiten zu den THP(B)-Biosynthesegenen aus halophilen Prokaryonten (*thpB* zu einer L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd-Transaminase und *thpC* zu einer AcDABA-Cyclase). *ThpD* zeigte hohe Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen. Die Expression von *thpC* und *thpD* in *E. coli* führte in beiden Fällen zu inaktiven Enzymen. Die Gene wurden daher in *Streptomyces lividans* unter der Kontrolle des *mel*-Promotors als Hexa-His-Fusionsprotein exprimiert. Im Falle von *thpC* konnte jedoch neben der endogenen Enzymaktivität keine Zunahme der AcDABA-Cyclaseaktivität festgestellt werden. Dagegen führte die Expression von *thpD* in *S. lividans* zu einem Protein mit der erwarteten Größe von 34,1 kDa. Nach der Aufreinigung zur Homogenität konnte gezeigt werden, daß das durch *thpD* kodierte Protein die  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängige Hydroxylierung von THP(B) zu THP(A) katalysiert. Als Cofaktor wurde  $\text{Fe}^{2+}$  benötigt. Eine Stimulierung der Hydroxylaseaktivität konnte durch Zugabe von Ascorbinsäure und Katalase erreicht werden. Damit wurde erstmals die Hydroxylierung von THP(B) zu THP(A) *in vitro* durchgeführt. Im 5'-Bereich von *thpA* befindet sich *orfB*, der für eine mögliche Aspartat-Aminotransferase kodiert. Da der Vorläufer der THPs das L-Aspartat ist, könnte auch dieses Gen an der THP-Biosynthese beteiligt sein. Im 3'-Bereich von *thpD* folgt *orfC* und *orfD*. Das von *orfC* abgeleitete Protein zeigte bei der Datenbankanalyse keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Der nach *orfC* in entgegengesetzter Orientierung zu den THP-Genen folgende *orfD* kodiert für ein Protein, das hohe Ähnlichkeiten zu NADH abhängigen Oxidoreduktasen zeigt. Durch diese Daten war es erstmals möglich, den Mechanismus der THP(B)- und insbesondere der THP(A)-Biosynthese in *Streptomyces chrysomallus* aufzuklären und die *in vitro* Synthese von THP(B) und THP(A), ausgehend von der L-2,4-Diaminobuttersäure, durchzuführen.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AcDABA	N-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
Ci	Curie
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
DABA	L-2,4-Diaminobuttersäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minute
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THP(A)	2-Methyl-4-carboxy-5-hydroxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin
THP(B)	2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Streptomyceten, eine Gruppe biotechnologisch wichtiger Bodenbakterien	1
1.2. Osmoadaption .....	2
1.3. Die Osmolyte der Mikroorganismen .....	3
1.4. Transport von Osmolyten .....	5
1.5. Regulation der osmotischen Stressantwort .....	6
1.6. Die Tetrahydropyrimidin-Osmolyte .....	7
1.7. Biosynthese von THP(A) und THP(B) .....	9
1.8. Einfluß von THP(A) und THP(B) auf das Wachstum von Mikroorganismen bei Salz- und Hitzestress .....	10
1.9. Einfluß von THP(A) und THP(B) auf Proteinstrukturen .....	11
1.10. Stabilisierung von DNA durch THP(A) und THP(B) .....	12
1.11. Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten von THP(A) und THP(B) ..	13
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materialien .....</b>	<b>15</b>
3.1. Mikroorganismen .....	15
3.2. Vektoren .....	15
3.3. Oligonukleotide und Nukleinsäuren .....	15
3.4. Nährmedien .....	15
3.5. Puffer und Lösungen .....	17
3.5.1. Antibiotika und Zusätze in Medien .....	17
3.5.2. DNA-Präparationen .....	17
3.5.3. Southernhybridisierung .....	17
3.5.4. DNA-Sequenzierung .....	18
3.5.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	18
3.5.6. Immunoblott .....	18
3.5.7. Proteinnachweis .....	18
3.5.8. Puffer für die Reinigung der Acetyltransferase aus <i>S. chrysomallus</i> .....	19
3.5.9. Puffer für die Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine .....	19
3.5.10. Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie .....	19
3.6. Feinchemikalien .....	20

3.7. Radiochemikalien.....	20
3.8. Enzyme und Antikörper.....	21
3.9. Kits .....	21
3.10. Säulenmaterialen .....	21
3.11. Membranen.....	21
3.12. Geräte .....	22
<b>4. Methoden.....</b>	<b>23</b>
4.1. Anzucht von Mikroorganismen .....	23
4.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	23
4.1.2. Kultivierung von <i>Streptomyces chrysomallus</i> X2 .....	23
4.1.3. Kultivierung von <i>Streptomyces lividans</i> .....	23
4.2. Methoden zur Isolierung von DNA .....	23
4.2.1. Präparation chromosomaler DNA aus <i>Streptomyceten</i> .....	23
4.2.2. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	24
4.2.3. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Streptomyceten</i> .....	24
4.2.4. Isolierung des Gens der Acetyltransferase ( <i>thpA</i> ).....	24
4.2.4.1. Cosmidgenbank von <i>S. chrysomallus</i> .....	24
4.2.4.2. Koloniehybridisierungsscreening.....	24
4.3. Charakterisierung von DNA.....	25
4.3.1. Restriktionsspaltung von DNA.....	25
4.3.2. Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	25
4.3.3. Sequenzierung.....	25
4.3.4. Sequenzauswertung .....	27
4.4. Southern Hybridisierung.....	27
4.4.1. Markierung von DNA-Fragmenten.....	27
4.4.2. Transfer von chromosomaler oder Plasmid-DNA auf eine Nylonmembran .....	27
4.4.3. Hybridisierung.....	27
4.5. Klonierungsexperimente .....	29
4.5.1. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	29
4.5.2. Dephosphorylierung.....	29
4.5.3. Ligation .....	29
4.5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
4.5.5. Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen .....	30
4.5.6. Protoplastentransformation bei <i>Streptomyceten</i> .....	30
4.6. Heterologe Expression der <i>thp</i> -Gene in <i>E. coli</i> .....	30
4.6.1. Plasmidkonstrukte zur Expression in <i>E. coli</i> .....	31
4.6.1.1. <i>pQE30thpA</i> .....	31
4.6.1.2. <i>pQE50thpA</i> .....	31
4.6.1.3. <i>pQE30thpC</i> .....	31
4.6.1.4. <i>pQE50thpC</i> .....	32
4.6.1.5. <i>pQE30thpD</i> .....	32

4.6.1.6.	<i>pQE50thpD</i> .....	32
4.7.	Expression der Gene <i>thpC</i> und <i>thpD</i> in <i>S. lividans</i> .....	33
4.7.1.1.	<i>pSPIJthpC</i> .....	34
4.7.1.2.	<i>pSPIJthpD</i> .....	34
4.8.	Insertionsinaktivierung .....	35
4.9.	Proteinchemische Methoden.....	36
4.9.1.	Reinigung der DABA-Acetyltransferase aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> X2.....	36
4.9.1.1.	Herstellung eines zellfreien Rohextraktes.....	36
4.9.1.2.	Ammoniumsulfatfällung.....	37
4.9.1.3.	Gelfiltration über Ultrogel AcA54.....	37
4.9.1.4.	Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose.....	37
4.9.1.5.	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose .....	37
4.9.1.6.	Gelfiltration über Superdex75pg.....	38
4.9.1.7.	Hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ .....	38
4.9.2.	Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i> .....	38
4.9.2.1.	Affinitätschromatographie an Nickelchelate-Matrix .....	38
4.9.3.	Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine aus <i>S. lividans</i> .....	39
4.10.	Enzymatische Untersuchungen.....	39
4.10.1.	Bestimmung der Acetyltransferase-Aktivität.....	39
4.10.2.	Bestimmung der Substratspezifität des THPA-Hexa-His-Fusionsproteins .....	40
4.10.3.	Bestimmung der AcDABA-Cyclase Aktivität.....	40
4.10.4.	Bestimmung der Aktivität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins .....	40
4.10.5.	Substratspezifität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins.....	41
4.10.6.	Stabilitätsbestimmung des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins .....	41
4.11.	Protein Nachweisverfahren .....	41
4.11.1.	Proteinbestimmung.....	41
4.11.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	41
4.11.3.	Semi-Dry-Blotting.....	42
4.11.4.	Immunofärbung.....	42
4.12.	Proteinfragmentierung und N-terminale Sequenzierung .....	42
4.12.1.	Tryptischer im Gel-Verdau der DABA-Acetyltransferase .....	42
4.12.2.	N-terminale Sequenzierung der DABA-Acetyltransferase.....	43
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
5.1.	Isolierung und Charakterisierung der L-2,4 Diaminobuttersäure-Acetyltransferase aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> .....	44
5.1.1.	Nachweis der L-2,4 Diaminobuttersäure-Acetyltransferase in <i>Streptomyces chrysomallus</i> .....	44
5.1.2.	Reinigung der DABA-Acetyltransferase .....	45
5.1.3.	Bestimmung der N-terminalen Sequenz der DABA-Acetyltransferase .....	47
5.1.4.	Bestimmung von internen Peptidsequenzen der DABA-Acetyltransferase .....	47
5.2.	Klonierung der DABA-Acetyltransferase .....	48
5.2.1.	Analyse von Cosmid cosAF1.....	48
5.3.	Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen.....	52

5.3.1.	Analyse von <i>thpA</i> .....	59
5.3.2.	Analyse von <i>thpB</i> .....	61
5.3.3.	Analyse von <i>thpC</i> .....	63
5.3.4.	Analyse von <i>thpD</i> .....	64
5.3.5.	Analyse von <i>orfA</i> .....	66
5.3.6.	Analyse von <i>orfB</i> .....	66
5.3.6.1.	Eingruppierung von THPB und ORFB in das System der Aminosäure- Transaminasefamilien.....	68
5.3.7.	Analyse von <i>orfC</i> .....	69
5.3.8.	Analyse von <i>orfD</i> .....	69
5.4.	Versuch zur Insertionsinaktivierung von <i>thpA</i> und <i>thpB</i> .....	71
5.5.	Expression von <i>thpA</i> , <i>thpC</i> und <i>thpD</i> in <i>E. coli</i> bzw. <i>S. lividans</i> .....	71
5.5.1.	Expression von <i>thpA</i> in <i>E. coli</i> M15 als Hexa-HIS-Fusionsprotein.....	71
5.5.1.1.	Charakterisierung des Hexa-His-THPA-Fusionsproteins.....	73
5.5.1.2.	Bestimmung der Km-Werte für das Hexa-His-THPA-Fusionsprotein .....	75
5.5.1.3.	Expression von <i>thpD</i> in <i>E. coli</i> M15 als Hexa-His-Fusionsprotein .....	77
5.5.1.4.	Untersuchung des in <i>E. coli</i> M15 gebildeten Hexa-His-THPD-Fusionsproteins ..	78
5.5.2.	Expression von <i>thpD</i> in <i>E. coli</i> M15 ohne Hexa-His-Tag .....	79
5.5.3.	Expression von <i>thpD</i> als Hexa-His-Fusionsprotein in <i>Streptomyces lividans</i> .....	79
5.5.3.1.	Untersuchung des in <i>Streptomyces lividans</i> gebildeten Hexa-His-THPD- Fusionsproteins.....	80
5.5.3.2.	Messung der kinetischen Parameter der Hydroxylierungsreaktion.....	82
5.5.3.3.	Einfluß von Ascorbinsäure und Katalase auf die Hydroxylierung von THP(B) ....	82
5.5.3.4.	Stabilität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins aus <i>S. lividans</i> .....	83
5.5.4.	Expression von <i>thpC</i> in <i>E. coli</i> M15 als Hexa-HIS-Fusionsprotein .....	84
5.5.4.1.	Aktivitätsanalyse des THPC-Fusionsproteins .....	85
5.5.5.	Expression von <i>thpC</i> in <i>E. coli</i> M15 ohne Hexa-His-Tag .....	86
5.5.6.	Expression von <i>thpC</i> als Hexa-His-Fusionsprotein in <i>Streptomyces lividans</i> .....	86
5.5.6.1.	Nachweis einer AcDABA-Cyclase Aktivität aus <i>S. lividans</i> .....	87
5.5.6.2.	Aufreinigung der potentiellen AcDABA-Cyclase aus <i>S. lividans</i> pSPIJthpC.....	90
5.5.6.3.	Überprüfung der Reversibilität der THP(B)-Bildung.....	91
6.	<b>Diskussion</b> .....	<b>92</b>
6.1.	Isolierung und Charakterisierung der L-2,4-Diaminobuttersäure Acetyltransferase aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> .....	92
6.2.	Klonierung der DABA-Acetyltransferase .....	93
6.3.	Analyse der weiteren THP-Biosynthesegene .....	94
6.3.1.	Organisation der THP-Gene in verschiedenen Mikroorganismen.....	95
6.4.	Analyse von <i>orfA</i> , <i>orfB</i> , <i>orfC</i> und <i>orfD</i> .....	96
6.5.	Expression von <i>thpA</i> , <i>thpC</i> und <i>thpD</i> in <i>E. coli</i> M15 bzw. <i>Streptomyces lividans</i> .....	98
6.5.1.	Charakterisierung der rekombinanten DABA-Acetyltransferase (THPA) .....	99
6.5.2.	Analyse von <i>thpD</i> .....	100
6.5.3.	Expression von <i>thpC</i> in <i>E. coli</i> M15 und <i>S. lividans</i> .....	102
7.	<b>Literatur</b> .....	<b>104</b>



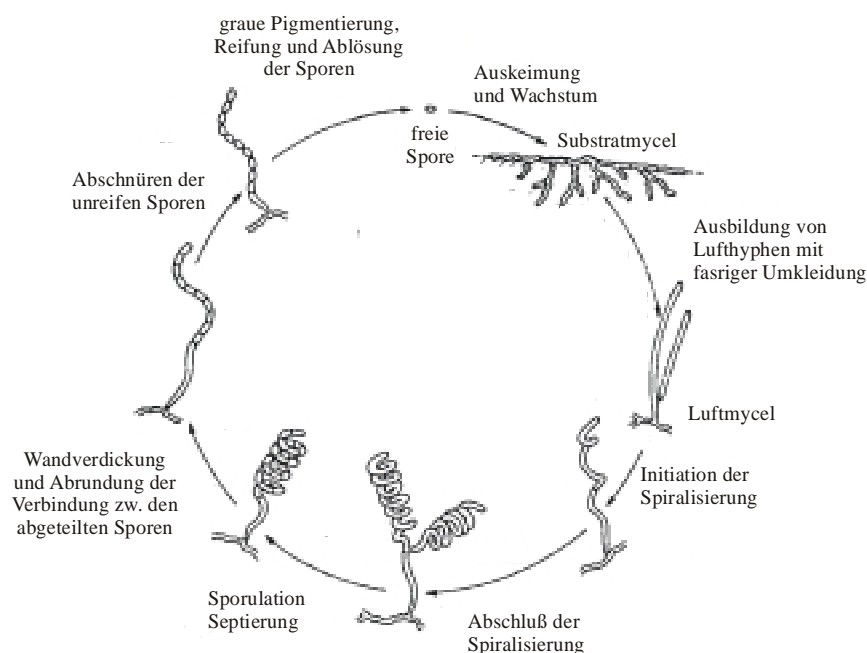
## 1. Einleitung

### 1.1. Streptomyceten, eine Gruppe biotechnologisch wichtiger Bodenbakterien

Die Streptomyceten zählen zu den Eubakterien und werden in die zweite große Gruppe der gram-positiven Bakterien, den coryneformen Bakterien und Actinomyceten, eingeordnet. Die Actinomyceten sind unbewegliche, überwiegend apathogene, filamentös wachsende, obligat aerobe Bodenbakterien, deren DNA einen hohen G+C-Gehalt von durchschnittlich 74% aufweist [Stackebrand und Woese, 1981]. In kodierenden Bereichen steigt dieser G+C-Gehalt an der dritten Kodonposition sogar auf 76 bis 99% an [Wright und Bibb, 1992].

Die Nutzung von unlöslichen organischen Bodenbestandteilen als Nährstoffquelle für den anabolen und katabolen Stoffwechsel wird durch die Sekretion von hydrolytisch wirkenden Exoenzymen gewährleistet. Aufgrund dieser Eigenschaft leisten die Streptomyceten einen Beitrag zum Mineralisierungsprozeß im Boden. Die Ordnung der Actinomycetales zeichnet sich darüber hinaus durch die Fähigkeit aus, sehr viele niedermolekulare Naturstoffe und wichtige extrazelluläre Enzyme zu synthetisieren.

Während ihres Lebenszyklus durchlaufen Streptomyceten verschiedene Stadien der morphologischen Differenzierung (Abb.1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der morphologischen Differenzierung von Streptomyceten anhand des Entwicklungszyklus nach Chater und Merrick [1979].**

Ausgehend von einer Spore entwickelt sich auf Festmedium ein Substratmyzel. Bei eintretender Nährstofflimitierung beginnt nach 16 bis 20 h die Bildung eines Luftmyzels. Aus diesem Luftmyzel schnüren sich später einzellige Arthosporen ab, wodurch der Lebenszyklus von neuem beginnen kann. Ein Austrocknen der Sporen wird durch einen hohen Trehalosegehalt verhindert. Eine Resistenz der Sporen gegen hohe Temperaturen wie bei Endosporen von *Bacillus* Arten besteht dagegen nicht [Ensign, 1978]. Mit der morphologischen Differenzierung geht eine Differenzierung auf physiologischer Ebene einher. Infolge von Nährstoffverknappung setzt zu Beginn der stationären Phase die Bildung von zahlreichen Sekundärmetaboliten in dieser Organismengruppe ein. Mehr als 70% aller bekannten bioaktiven niedermolekularen Substanzen werden durch Vertreter der Ordnung Actinomycetales gebildet. Zu den vielen Sekundärmetaboliten gehören u.a. die meisten Antibiotika, Immunsuppressiva, Herbizide, Enzyminhibitoren und auch Regulationsfaktoren, wobei die Antibiotika die größte Gruppe darstellt [Korn-Wendisch und Kutzner, 1992].

Auch in Streptomyceten bewirken Hitze und Nährstofflimitierung ähnliche Stressantworten wie bei *E. coli*. So wird eine Bildung von verschiedenen Hitzeschockproteinen, wie z.B. Chaperone (*DnaK*-Operon und Hsp60, Hsp70), Sigma-Faktoren und ATP-abhängige Proteasen (*clp*-Operon) beobachtet. Infolge ihres Standortes im Boden sind Streptomyceten mannigfaltigen Belastungen durch Umwelteinflüsse ausgesetzt. In Bezug auf den Salzstress, der bei Böden häufig infolge von Versalzung eine Rolle spielen kann, war bisher bei den Streptomyceten wenig bekannt. Maßgeblich für die Salzstressantwort, die bei den unizellulären Bakterien gut untersucht ist, ist die Osmoadaption, die durch intra- oder extrazelluläre Osmolyte erreicht werden kann.

## 1.2. Osmoadaption

Lebende Zellen besitzen Mechanismen, um sich vor hohen Salzkonzentrationen im extrazellulären Milieu zu schützen. Die Präsenz von Salz kann sich auf zweierlei Weise negativ auf die Zelle auswirken: zum einen durch einen nichtspezifischen osmotischen Effekt, zum anderen durch die spezifische Toxizität der Ionen für bestimmte zelluläre Strukturen wie Proteine und Membranen. Folgende Mechanismen gegen den Salzstress sind bekannt:

1. Aufbau eines osmotischen Gegendrucks, 2. Aufbau von Ionentransportsystemen und 3. die Bildung von Stressantwortproteinen.

In *E. coli* ist die Hauptursache der Toxizität von Salz sein osmotischer Effekt. Isoosmotische Konzentrationen von NaCl und Saccharose zeigen beispielsweise den gleichen inhibierenden Effekt. [Csonka, 1981; Csonka und Hanson, 1991]. Die Salztoleranz von *E. coli* wird daher unter normalen Bedingungen durch die Etablierung eines osmotischen Gegendrucks reglementiert. Dies kann entweder durch Synthese von intrazellulären Osmolyten bzw. durch die Aufnahme von externen Osmolyten aus der Umgebung geschehen.

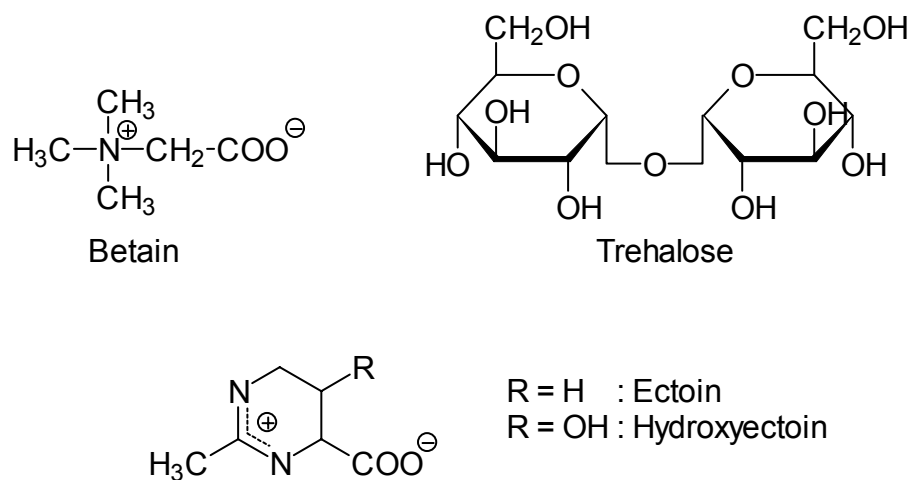
Unter bestimmten physiologischen Bedingungen ist jedoch NaCl für *E. coli* toxisch. Zur Vermeidung dieses toxischen Effekts besitzt *E. coli* ein aktives Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter System, welches die intrazelluläre Natriumkonzentration reguliert [Pinner *et al.*, 1992]. Mutanten mit einem Defekt in diesem Natriumtransportsystem sind salzsensitiv.

Bei den extrem halophilen Bakterien wurde noch ein weiterer Mechanismus gefunden [Vreeland, 1987]. Diese Bakterien akkumulieren Kaliumchlorid bzw. Natriumchlorid in ihrem Cytoplasma, um ein osmotisches Gleichgewicht an der Cytoplasmamembran zu erlangen. Dies führt zu einer hohen ionischen Konzentration im Cytoplasma, was wiederum zu einer Anpassung der im Cytoplasma vorhandenen Strukturen führt. So ist z.B. bei diesen Bakterien ein höherer Gehalt an sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) in den Proteinen zu finden als bei vergleichbaren Proteinen der nichthalophilen Bakterien [Lanyi, 1974]. Aufgrund ihrer negativen Ladung können diese Proteine eine besser stabilisierende Hydrathülle bilden.

### 1.3. Die Osmolyte der Mikroorganismen

Für die Schaffung eines osmotischen Gegendrucks, bei der Anwesenheit von Salz, besitzen die meisten mikrobiellen Organismen die Fähigkeit niedermolekulare organische Verbindungen, die sogenannten Osmolyte, zu bilden. Es handelt sich bei diesen Stoffen um kleine organische Moleküle, die hohe Wasserlöslichkeit besitzen, beim physiologischen pH-Wert keine Nettoladung besitzen und in der Regel keinen oder nur geringen Einfluß auf den Stoffwechsel der Zellen aufweisen. Die hauptsächlichen Osmolyte in Mikroorganismen und Pflanzen sind Polyole (Glycerol, Sorbit und Mannit), nichtreduzierende Zucker wie Saccharose

und Trehalose, Aminosäuren (Glutamat, Prolin und Betain) und die Tetrahydropyrimidinderivate Ectoin und Hydroxyectoin. Die Osmolyte sind nicht nur kompatibel mit den nativen Zuständen von Proteinen und Membranen, sondern sie stabilisieren deren Strukturen auch gegen Dehydratation, Hitzeschock und denaturierende Reagenzien. Man beobachtet deshalb die Bildung von Osmolyten oft nicht nur als Folge osmotischen Stresses, sondern auch als Antwort auf Hitzestress, wenngleich in geringerem Ausmaß [Serrano, 1996; Brown, 1990; Malin und Lapidot, 1996].



**Abb. 2: Wichtige Osmolyte, die von Mikroorganismen gebildet werden.**

Osmolyte haben eine Doppelrolle im Metabolismus der Zelle. Offensichtlich dienen sie nicht nur zum Aufbau eines osmotischen Gegendrucks, sondern dienen auch als Kohlenstoff- oder Stickstoffreservoir. Synthese und Abbau dieser Verbindungen sind in der Regel koordiniert reguliert. Ihre Synthese ist gewöhnlich von einem aktiven Transport der Osmolyte in die Zelle begleitet. Dies gestattet die Aufnahme aus Zellen freigesetzter oder bereits im Medium vorhandener Osmolyte, wie z.B. das Glycerol im Falle von *Saccharomyces cerevisiae*. Osmolyte, die von der Zelle aufgenommen werden und nicht von ihr selbst synthetisiert werden, nennt man Osmoprotektanten [Kempf und Bremer 1998].

*E. coli*, das zusammen mit *B. subtilis* bestuntersuchte prokaryotische Modell der osmotischen Stressantwort, synthetisiert u.a. die zwei Osmolyte Glutamat und Trehalose, wobei die Akkumulation von Glutamat nur eine untergeordnete Rolle bei der Osmoadaption spielt [Csonka and Hanson, 1991]. Dies zeigt sich auch

darin, daß Mutanten, die keine Trehalose bilden können in Minimalmedium salzsensitiv sind [Giaever *et al.*, 1988]. Die Biosynthesegene der Trehalose bilden das *ots* Operon, welches durch osmotischen Stress induziert wird [Kaasen *et al.*, 1992]. Interessanterweise wird dieses Operon auch in der stationären Phase induziert und trägt zur Thermotoleranz bei [Hengge-Aronis, 1991]. *E. coli* kann unter osmotischem Stress auch Betain als weiteren Osmolyten synthetisieren [Lamark, 1991].

#### 1.4. Transport von Osmolyten

Neben der Fähigkeit Osmolyte *de novo* zu synthetisieren, besitzt *E. coli* Aufnahmesysteme, die es dem Bakterium ermöglicht Osmoprotektanten wie Prolin und Betain aus dem Medium aufzunehmen [Le Rudulier und Bouillard, 1983]. Zu diesen Aufnahmesystemen gehören die ABC-Transporter ProP bzw. ProU [Higgins *et al.*, 1988]. Das gram-positive Bakterium *B. subtilis* verfügt zur Aufnahme von Betain über drei osmoregulierte Systeme (OpuA und OpuC, ABC Typ) sowie den sekundären Carrier OpuD [Kappes *et al.*, 1996; Kempf und Bremer, 1995, 1998]. Über das ABC-Transportsystem OpuC kann neben Betain auch Ectoin akkumuliert werden [Jebbar, 1997]. Die zu den Actinomyceten gehörenden Corynebakterien besitzen vier sekundäre Carrier für Osmoprotektanten [Peter *et al.*, 1998]. BetP ist ein Glycin-Betain-Transporter mit 12 Transmembransegmenten, der zusätzliche cytoplasmatische Domänen am Aminoterminal und am C-Terminus trägt. BetP fungiert als Osmosensor und steuert die Osmoregulation [Peter *et al.*, 1998a]. PutP ist ein Prolinaufnahmesystem, welches analog zu dem System in *E. coli* nicht osmoreguliert ist. Weitere Carrier in den Corynebakterien sind ProP und EctP. In Eubakterien wie *E. coli* oder *C. glutamicum*, die Ectoin nicht selbst synthetisieren, wird Ectoin durch die Systeme ProU und ProP [Jebbar *et al.*, 1992] bzw. ProP und EctP [Peter *et al.*, 1998] aufgenommen. Ectoin wird, im Gegensatz zu Prolin, aber nicht metabolisiert.

### 1.5. Regulation der osmotischen Stressantwort

Für die Regulation der osmotischen Stressantwort in Bakterien wurden verschiedene Mechanismen gefunden. Die Regulation findet dabei hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation von *proU* in *E. coli*, einem bindungsproteinabhängigen Transportsystem für Betain [Higgins *et al.*, 1988], welches durch das Ausmaß von DNA Supercoiling in der Zelle beeinflusst wird [Hulton *et al.*, 1990]. Die Erhöhung der intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration ist für diesen Supercoilingeffekt direkt verantwortlich. Weitere Daten weisen aber auch auf die Bindung von alternativen Sigmafaktoren (RpoS), histonähnliche Proteine und „negative-regulatory-elements“ (NRE) an den Promotoren des Operons hin [Lucht *et al.* 1994; Gowrishankar und Manna, 1996].

„Two-component“ Regulationssysteme haben große Bedeutung für verschiedene Signaltransduktionswege in Bakterien und Hefen. Sie bestehen aus einem Sensor und einem Responseregulator [Saier, 1998]. Der Sensor ist meist ein Transmembranprotein mit einer Sensordomäne und einer Histidinkinasedomäne. Die Sensordomäne reagiert auf spezifische Änderungen im Extrazellulärraum, daraufhin phosphoryliert sich die Kinase selbst mit Phosphoenolpyruvat. Anschließend wird ein entsprechender Responseregulator phosphoryliert. Der phosphorylierte Responseregulator fungiert dann direkt als Transkriptionsregulator oder beeinflusst weitere Signalkaskaden in der Zelle [Gross *et al.*, 1989]. Die Komponenten solcher Signaltransduktionswege sind gut konserviert und können häufig auf der Basis ihrer Homologie identifiziert werden [Swanson *et al.*, 1994]. Beispiele für osmoregulierte „Two-component“ Systeme sind die Regulation des *kdpABC* Operons [Altendorf *et al.*, 1992] und der Porin Gene *ompF* und *ompC* [Stock *et al.*, 1989]. Im Falle des *kdpABC* Operons wird das „Two-component“ System durch die Gene *kdpD* und *kdpE* kodiert [Walderhaug *et al.*, 1992]. KpdD ist eine Sensorproteinkinase und KpdE ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Phosphorylierung durch KpdD an den Promoter des *kdpABC* Operons bindet [Sugiura *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1992]. Im Falle der Poringene *ompF* und *ompC* [Stock *et al.*, 1990] ist die Sensorkinase ebenfalls ein Membranprotein, das durch *envZ* kodiert wird. Diese Kinase phosphoryliert das *ompR* Genprodukt, das daraufhin die Transkription von *ompC* aktiviert und die von *ompF* inhibiert.

Weiterhin spielt der Sigma-Faktor  $\sigma^s$  als globaler Stressregulator eine bedeutende Rolle in der osmotischen Stressantwort von *E. coli* [Hengge-Aronis, 1996]. Sigma S wird vor allem in der stationären Phase exprimiert. Im Falle der osmotischen Stressantwort ist der Gehalt an Sigma S auch in Zellen der exponentiellen Phase erhöht. Dies beruht auf einer Stimulierung der Translation von *rpoS* durch das RNA-Bindungsprotein HF-1 und das histonähnliche Protein H-NS, welches auf ein komplexes regulatorisches Netzwerk der *rpoS* Regulation und seine Funktion als globaler Regulator hinweist.

Die Salzstressantwort wird aber nicht nur auf der Ebene der Transkription oder Translation, sondern auch durch direkte Aktivierung der beteiligten Proteine reguliert. Bei dem Aufnahmesystem *betP* von *Corynebacterium glutamicum* beobachteten Peter *et al.* [1998a], daß dieser Symporter C-terminale und N-terminale Extensionen besitzt, die für die direkte Regulation bzw. sofortige Aktivierung dieses Proteins mit Natriumchlorid oder Sorbit verantwortlich sind.

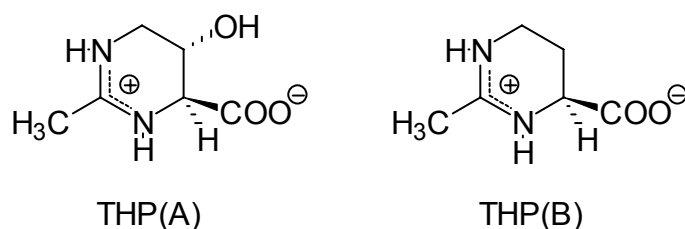
## 1.6. Die Tetrahydropyrimidin-Osmolyte

Besonders interessant sind die Prokaryonten saliner Standorte, wie z.B. Salzseen, Salinen und salzhaltige Böden. Sie können in extrem halophile und moderat halophile Organismen eingeteilt werden. Die Gruppe der extrem halophilen Bakterien beinhaltet Vertreter der *Holobacteriaceae*, einige methanogene Archaea und strikt anaerobe heterotrophe Eubakterien. Eine Besonderheit dieser Gruppe ist die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Salz (2,5 M bis hin zu gesättigten Salzlösungen) für deren Wachstum. Zu den Vertretern der moderat halophilen Bakterien gehören u.a. die Gruppen der *Halomonadaceae*, *Halobacillus*, *Marinococcus* und *Actinopolyspora* [Ventosa, 1998], bei denen ein optimales Wachstum im Bereich von 0,5-2,5 M Salz festgestellt werden konnte. Bakterien, die in der Abwesenheit von Salz sowie in Gegenwart von Salz (bis zu 2,5 M) wachsen können, werden als halotolerant bezeichnet (z.B. *Staphylococcus aureus*).

Halophile Eubakterien bilden intrazelluläre Osmolyte, bei denen das Ectoin (THP(B)) eine besondere Rolle spielt (Abb. 3). Die intrazelluläre Konzentration von Ectoin erreicht z.B. bei *Halomonas elongata* in Gegenwart von 10% NaCl 2,25 M [Galinski *et al.*, 1985; Wohlfarth *et al.*, 1990]. Das Ectoin hat eine extrem

hohe Löslichkeit in Wasser und schützt Proteine effizient vor Dehydratation [Lippert und Galinski 1992; Malin *et al.* 1999].

Interessanterweise haben Inbar und Lapidot bei Untersuchungen der Biosynthese des Sekundärmetabolits Actinomycin D in *Streptomyces parvulus* zwei intrazellulär vorkommende Tetrahydropyrimidine entdeckt. Bei diesen zwei Verbindungen handelt es sich um das THP(A) (2-Methyl-4-carboxy-5-hydroxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin) und das THP(B) (2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin) [Inbar und Lapidot, 1988].



**Abb. 3: Strukturformeln von THP(A) und THP(B)**

Eine Korrelation zwischen der THP(B)-Bildung und der Actinomycin D Produktion wurde postuliert. Darüber hinaus konnte die THP-Synthese durch Salzschock stimuliert werden, was eine Beteiligung von THP(A) und THP(B) neben der Trehalose an dem Mechanismus der Salztoleranz vermuten lässt [Malin und Lapidot, 1996]. Das THP(B) wurde zuvor auch in dem halophilen Bakterium *Ectothiorhodospira halochloris* gefunden und dort als Ectoin bezeichnet [Galinski *et al.*, 1985]. Dies deutet auf einen ähnlichen Mechanismus der Salztolerierung bei den Streptomyceten und den halophilen Bakterien hin. Im Unterschied hierzu wird bei *E. coli* und den G+C reichen Corynebakterien keine THP-Synthese festgestellt. Sie sind jedoch in der Lage externes THP(B) aufzunehmen, was zu einer erhöhten Salz- und Hitzetoleranz führt [Jebbar *et al.*, 1992; Malin und Lapidot, 1996]. Das THP(A) und das THP(B) bilden die somit am weit verbreitetste Klasse der Osmolyte bei den Eubakterien [Wohlfarth *et al.*, 1990].



### 1.7. Biosynthese von THP(A) und THP(B)

Die Synthese von THP(A) und THP(B) in Streptomyceten eröffnet die Möglichkeit den Salzstress in Streptomyceten anhand dieses Systems zu untersuchen. Dies kann vorzugsweise durch Analyse der Regulation des Biosynthesewegs durchgeführt werden.

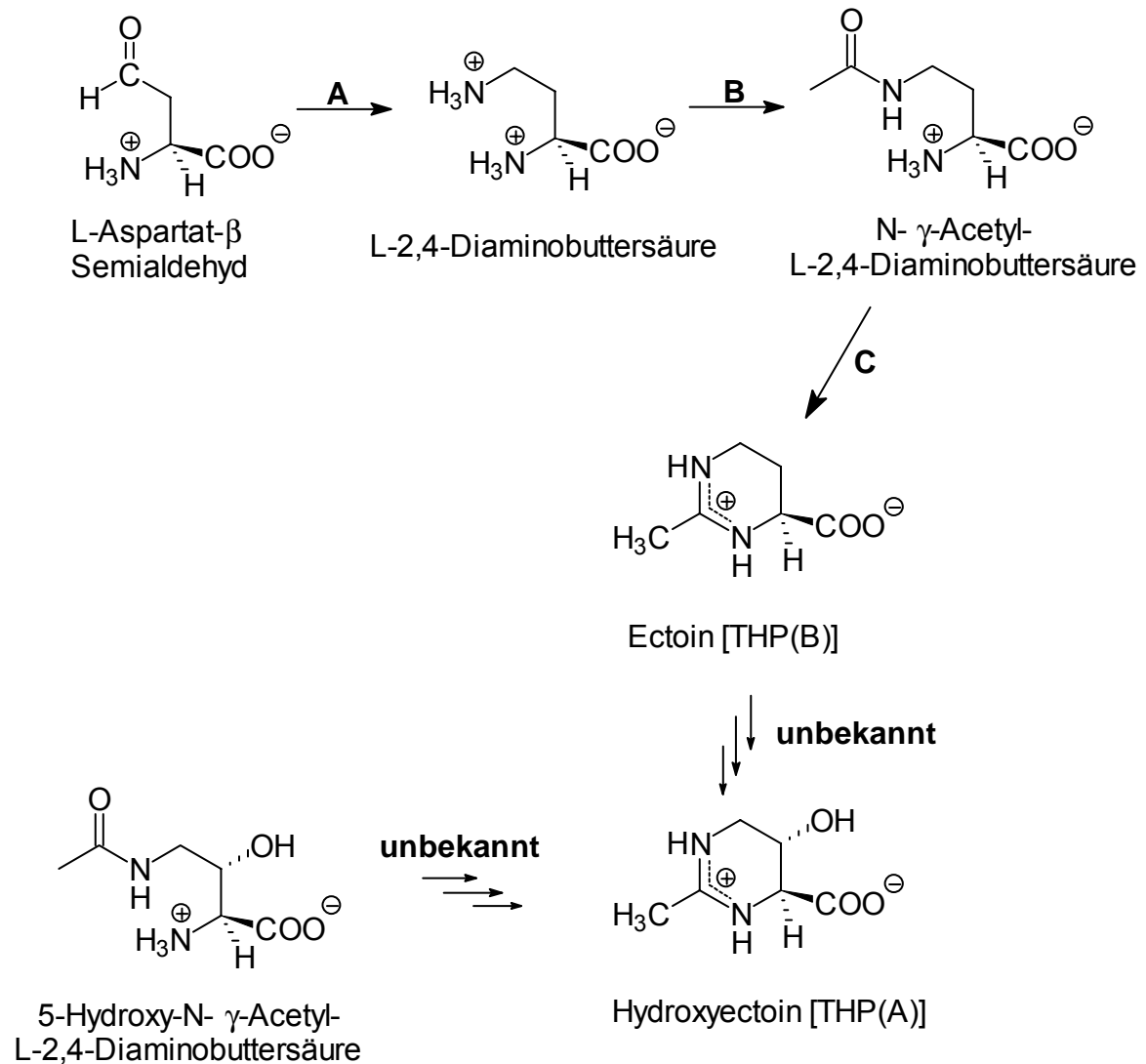
THP(B) (Ectoin) konnte erstmals aus *Ectothiorhodospira halochloris* isoliert werden. Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen Vertreter der extrem halophilen Bakteriengattung *Ectothiorhodospira* [Galinski *et al.*, 1985]. Das THP(B) sowie ein Derivat, das THP(A) (Hydroxyectoin), wurden zudem auch in verschiedenen Streptomyceten gefunden [Inbar und Lapidot, 1988a; Malin und Lapidot, 1996].

Studien der Biosynthese von Ectoin in *Marinococcus halophilus*, *Halomonas elongata* und *Ectothiorhodospira halochloris* haben gezeigt, daß N-Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure der unmittelbare Präkursor des Ectoins ist [Peters *et al.*, 1990]. Diese Zwischenstufe wird auch durch retrosynthetische Studien evident, da aus THP(B) nach der alkalischen Hydrolyse Acetat und 2,4-Diaminobuttersäure entsteht [Inbar und Lapidot, 1988].

Aus enzymatischen Studien bei *Ectothiorhodospira halochloris* wurde die N- $\alpha$ -Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure als Präkursor des Ectoins postuliert [Peters *et al.*, 1990]. Spätere Untersuchungen an Deletionsmutanten von *Marinococcus halophilus* und an Blockmutanten von *Halomonas elongata* haben jedoch zu einer Akkumulation von N- $\gamma$ -Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure geführt [Louis und Galinski, 1997; Canovas *et al.*, 1997]. Es ist daher bisher noch nicht eindeutig geklärt, ob die Biosynthese von Ectoin ausschließlich über die  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Acetyl-Diaminobuttersäure verläuft. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die Biosynthese von Ectoin aus L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd durch die L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase, L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase und der N-Acetyl-Diaminobuttersäure-Cyclase (Ectoin-Synthase) katalysiert wird (Abb.4).

Der erste enzymatische Schritt der Ectoinbiosynthese ist die Bildung von L-2,4-Diaminobuttersäure aus L-Aspartat-Semialdehyd, die durch die L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase katalysiert wird (Schritt A). Anschließend erfolgt die Acetylierung von 2,4-Diaminobuttersäure (Schritt B). Die Bildung von Ectoin erfolgt durch die Kondensation der gebildeten N-Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure

(Schritt C) [Peters *et al.*, 1990; Takano *et al.*, 1993]. Die Synthese von Hydroxyectoin ist bisher noch nicht geklärt.



**Abb. 4: Biosynthese von THP(B) ausgehend von L-Aspartat-β-Semialdehyd**

A: L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase B: L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase, C: N-Acetyl-Diaminobuttersäure-Cyclase. Die Biosynthese von Hydroxyectoin ist bisher noch nicht geklärt.

### 1.8. Einfluß von THP(A) und THP(B) auf das Wachstum von Mikroorganismen bei Salz- und Hitzestress

Als Antwort auf eine Zunahme der Osmolarität besitzt *E. coli* die Möglichkeit Trehalose zu synthetisieren. Dabei dient die Trehalose gleichzeitig als Kohlenstoffquelle [Dinnbier *et al.*, 1988; Giaever *et al.*, 1988]. Der zweite wichtige Osmolyt ist Glycin-Betain. Die Akkumulation von Glycin-Betain kann

entweder direkt durch die Aufnahme von Betain oder durch Synthese aus exogenen Cholin erfolgen. Durch das Vorhandensein der Transportsysteme ProP und ProU kann *E. coli* darüber hinaus Ectoin, welches von *E. coli* nicht synthetisiert werden kann, aufnehmen. So ist bei steigender Ectoinkonzentration in einem Medium mit erhöhter Osmolarität ein Anstieg der Zelldichte zu beobachten [Jebbar *et al.*, 1992]. Durch Zugabe von extrazellulärem Hydroxyectoin (THP(A)) oder Ectoin (THP(B)) konnte die durch osmotischen Stress verursachte Inhibierung des Wachstums von *E. coli* ebenfalls aufgehoben werden. Zudem konnte eine Induktion der Hitzetoleranz durch THP(A) in *E. coli* festgestellt werden. So konnte durch Zugabe von 20 µg/ml THP(A) zum Medium ein Wachstum von *E. coli* bei 43°C beobachtet werden [Malin und Lapidot, 1996]. Der Effekt, daß THP(B) eine durch osmotischen Streß verursachte Inhibierung des Wachstums aufhebt, wurde zudem auch bei *Corynebakterium glutamicum* [Farwick *et al.*, 1995] und *Rhizobium meliloti* [Talibart *et al.*, 1994] gezeigt.

### 1.9. Einfluß von THP(A) und THP(B) auf Proteinstrukturen

Die Enzymstabilisierung durch Ectoin und andere Osmolyte wurde u.a. von Lippert und Galinski untersucht. Dazu wurde die Lactatdehydrogenase (LDH) und die Phosphofructokinase (PFK) verschiedenen Stressfaktoren wie erhitzen, gefrieren und trocknen ausgesetzt [Lippert und Galinski, 1992]. Es konnte gezeigt werden, daß alle getesteten Osmolyte zu einer Stabilisierung der Proteine unter den verschiedenen Streßbedingungen beitrugen. Es gab jedoch große Unterschiede bei der Stabilisierung durch die Osmolyte sowohl bezüglich der Streßbedingungen als auch der untersuchten Proteine. Das THP(A) (Hydroxyectoin) erwies sich in den meisten Ansätzen als der am besten stabilisierende Osmolyt. So konnte u.a. bei der PFK ein Anstieg der T<sub>D-50</sub>-Temperatur (Temperatur, bei der 50% der ursprünglichen Aktivität vorliegt) um 14 °C in Gegenwart von 1 M THP(A) festgestellt werden.

Als Grund für die Stabilisierung von Proteinen wird der Ausschluß von Osmolyten an der Proteinoberfläche angenommen [Arakawa und Timasheff, 1985]. Dies führt zu einer Zunahme der Entropie, was wiederum zu einer Stabilisierung der Proteinstruktur als Folge der Minimierung der Kontaktflächen zwischen dem Lösungsmittel und dem Protein, führt.

Ein besonderer Unterschied wird bei der Betrachtung der Streßfaktoren Trocknung bzw. Gefrierung festgestellt [Crowe, 1990]. So wird bei der Trocknung von Proteinen eine vollständige Dehydratation festgestellt, im Gegensatz zum Gefrieren, wo das nicht gefrorene Wasser noch 20 bis 40% des Trockengewichts ausmacht. Dies erfordert im Falle der Trocknung spezielle Osmolyte, die über Wasserstoffbrückenbindungen eine Stabilisierung der Proteine bewirken. Dies kann z.B. durch Wechselwirkungen zwischen Hydroxylgruppen des Osmolyten und polaren Gruppen des Proteins erfolgen. Bei dem Vergleich zwischen Ectoin und Hydroxyectoin wird dies besonders deutlich. So ist bei LDH und PFK nach dem Gefriertrocknen im Falle des Hydroxyectoins noch 70% der Aktivität nachweisbar, im Gegensatz zum Ectoin, wo nur noch 10% der ursprünglichen Aktivität vorhanden war [Lippert und Galinski, 1992].

#### **1.10. Stabilisierung von DNA durch THP(A) und THP(B)**

Inbar und Lapidot entdeckten in Actinomycin produzierenden Streptomyceten die niedermolekularen Tetrahydropyrimidine THP(A) und THP(B) und stellten eine Korrelation der Bildung von THP(B) mit der Actinomycinproduktion her [Inbar und Lapidot, 1988]. Die Autoren postulierten eine Rolle der THPs bei der Selbstresistenz des Produzenten gegen das von ihm selbst gebildete Antibiotikum Actinomycin D, die in der Fähigkeit der THPs begründet sein könnte, die Wechselwirkung des Cytostatikums mit der DNA zumindest partiell zu unterbinden. Lapidot und Mitarbeiter zeigten zudem, daß die THPs Protein/Nukleinsäure Wechselwirkungen inhibieren können, so wurde z.B. eine Inhibition der Tat/Tar Wechselwirkung bei der Replikation von HIV beobachtet [Lapidot *et al.*, 1995]. Eine Unterstützung der Annahme, daß die THPs im Mechanismus der Selbstresistenz involviert sind, war auch die Entdeckung, daß THPs die Wirkung bestimmter DNA bindender Antitumorwirkstoffe veränderten, höchstwahrscheinlich durch Veränderung des DNA-Bindungsverhaltens [Lapidot A., pers. Mitt.].

Eine Inhibierung der durch Endonuklease katalysierten Spaltung von DNA durch DNA-bindende Liganden wurde bereits für eine Reihe von DNA interkalierenden Verbindungen, wie z.B. Actinomycin D, beschrieben [Cundliffe, 1989]. Darüber hinaus ist bekannt, daß Polyamine wie z.B. Putrescin und Spermin eine Inhibierung der durch Endonukleasen katalysierte DNA-Spaltung bewirken

[Pingoud, 1984; Kuosmanen und Poso, 1985]. Die Untersuchungen von Malin *et al.* zeigten, daß das THP(A) ebenfalls eine inhibierende Eigenschaft in Bezug auf Endonukleasen hat, so wurde eine zunehmende Inhibierung von *EcoRI* in Gegenwart von 0,2 bis 2,0 mM THP(A) festgestellt [Malin *et al.*, 1999].

### **1.11. Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten von THP(A) und THP(B)**

Neben dem Einsatz von THP(A) und THP(B) zum Schutz von DNA und Proteinstrukturen sind noch die folgenden Anwendungsgebiete möglich:

1. Aufgrund ihrer molekularen Struktur besitzen die THPs hygroskopische Eigenschaften, die Verwendung in der kosmetischen Industrie finden könnten [Motitschke *et al.*, 1995].
2. Durch Einsatz von THP(B) kommt es zu einer Erhöhung der Osmotoleranz von Produktionsstämmen, die zu einer erhöhten Zelldichte, und damit zur Steigerung der Menge des gewünschten Fermentationsprodukts führt [Yasuhiro *et al.* 1996].
3. Optimierung der Produktion von L-Aminosäuren durch Verwendung von THP(B) im Kulturmedium [Yasuhiko *et al.*, 1997].
4. Solubilisierung rekombinanter Proteine: Durch gezielte Anwendung von osmotischem Streß in Gegenwart des Osmolyten Betain konnte in einigen Fällen eine höhere Ausbeute nativer, löslicher Proteine *in vivo* beobachtet werden [Blackwell und Horgan, 1991].
5. Durch Hydrolyse können aus THP(A) und THP(B) verschiedene chirale Verbindungen, die in der chemischen Synthese Verwendung finden könnten, erhalten werden.

## 2. Zielsetzung

Die Tetrahydropyrimidine THP(A) und THP(B) wurden auch in dem Actinomycin produzierenden *Streptomyces parvulus* gefunden [Inbar *et al.*, 1988]. Aufgrund des zeitlichen Verlaufs bei der Bildung von THP(A) und THP(B) wurde ein Zusammenhang mit der Produktion von Actinomycin D postuliert. Da das Hauptarbeitsgebiet der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. U. Keller, Max-Volmer-Institut, TU-Berlin, die Biosynthese des Actinomycins in *Streptomyces chrysomallus* ist, war es wichtig zu wissen, ob die THP-Biosynthesegene mit den Biosynthesegenen des Actinomycins gekoppelt sind. Es sollten daher in der vorliegenden Arbeit die THP-Biosynthesegene in *Streptomyces chrysomallus* isoliert und charakterisiert werden, um die mögliche Rolle der THPs bei der Selbstresistenz von *S. chrysomallus* gegen das von ihm selbst gebildete Antibiotikum zu klären. Darüber hinaus sollte die *in vitro* Synthese von THP(A) und THP(B) etabliert werden.

### 3. Materialien

#### 3.1. Mikroorganismen

<i>Streptomyces chrysomallus</i> SC1	ATCC 11523
<i>Streptomyces chrysomallus</i> X2	Keller
<i>Streptomyces lividans</i> TK64	John Innes Collection
<i>E. coli</i> JM 109	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> M15	Qiagen, Hilden

#### 3.2. Vektoren

pTZ18U	Mead <i>et al.</i> , 1986
pSP72	Promega, Mannheim
pQE30	Qiagen, Hilden
pQE50	Qiagen, Hilden
pIJ702	Katz <i>et al.</i> , 1983
pSPIJ002	Eigenentwicklung

#### 3.3. Oligonukleotide und Nukleinsäuren

Lamda-DNA	BRL, Eggenstein
<u>Sequenzierungsprimer</u>	Amersham, Braunschweig

- a) Universal cycle primer: 5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3'
- b) Reverse cycle primer: 5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTC-3'

Alle weiteren PCR-Primer oder Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma TIB-MOLBIOL (Berlin) bezogen.

#### 3.4. Nährmedien

Die verwendeten Medien wurden 20 min bei 121°C sterilisiert. Zuckerhaltige Medien wurden 20 min bei 110°C autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2xYT (*E.coli* Vollmedium, Sambrook *et al.*, 1989)

auf 1 Liter	Bacto-Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g

Zur Selektion auf plasmidhaltige *E.coli* Zellen wurden dem maximal 60°C warmen Agar bzw. dem abgekühlten Flüssigmedium die entsprechenden Zusätze wie Ampicillin (100µg/ml), Kanamycin (25µg/ml), IPTG (50µg/ml) und/oder X-Gal (40µg/ml) zugesetzt.

HMM („CM“-Vollmedium für Streptomyceten, Keller *et al.*, 1985)

auf 1 Liter	Hefeextrakt	5 g
	Malzextrakt	5 g
	Maltose	5 g

pH-Wert ggf. mit KOH auf 7,2 - 7,5 eingestellt

YEME (Flüssigmedium für *S. lividans*, Hopwood *et al.*, 1985)

auf 1 Liter	Hefeextrakt	3 g
	Malzextrakt	3 g
	Bacto-Pepton	5 g
	Glucose	10 g
	Saccharose	340 g

pH-Wert ggf. mit KOH auf 7,2 eingestellt

Nach dem Autoklavieren bzw. unmittelbar vor Gebrauch wurde dem Medium MgCl<sub>2</sub>-Lösung (2,5 M) bis zu einer Endkonzentration von 0,2% zugegeben.

R2YE bzw. R5 (Regenerationsmedium von protoplastierten Streptomyceten, Hopwood *et al.*, 1985)

auf 800 ml	Saccharose	103 g
	Glucose	10 g
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,1 g



Je 160 ml wurden mit 3 g Agar versetzt und autoklaviert. Unmittelbar vor dem Gießen der Platten wurden pro Kolben folgende Lösungen zugegeben:

0,5%ige $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lsg.	2 ml
3,68%ige $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -Lsg.	16 ml
20%ige L-Prolin-Lsg.	3 ml
5,73%iger TES-Puffer, pH 7,2	20 ml
1 M NaOH-Lsg.	1 ml
10%ige Hefeextrakt-Lsg.	10 ml

Zur Selektion auf plasmidtragende *Streptomyces*-Stämme (pIJ702 und pSPIJ002 Konstrukte) wurde dem maximal 50°C warmen Medium Thiostrepton zugesetzt (Endkonzentration 25 µg/ml).

### 3.5. Puffer und Lösungen

#### 3.5.1. Antibiotika und Zusätze in Medien

Ampicillin-Lsg.:	100 mg/ml Ampicillin (Sigma) in Wasser
Kanamycin-Lsg.:	100 mg/ml Kanamycin (Sigma) in Wasser
Thiostrepton-Lsg.:	50 mg/ml Thiostrepton (Bristol-Myers-Squibb) in DMSO
X-Gal-Lsg.:	2% (w/v) X-Gal (Biomol) in Dimethylformamid
IPTG-Lsg.:	1 M IPTG (Biomol) in Wasser
Cycloheximid-Lsg.:	1,5 g Cycloheximid; 7,5 ml Aceton; ad. 100 ml $\text{H}_2\text{O}$

#### 3.5.2. DNA-Präparationen

RNase-Lsg.:	10 mg/ml Ribonuclease aus Rinderpankreas in TE-Puffer
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
DNA-Probenpuffer:	0,25% Bromphenolblau; 50% Saccharose
10 x TBE:	900 mM Tris; 900 mM Borsäure; 40 mM EDTA

#### 3.5.3. Southernhybridisierung

Denaturierungslösung:	1 M NaOH; 1 mM EDTA
Neutralisierungslösung:	5 M Ammoniumacetat pH 4,6

20 x SSC:	3 M NaCl; 300 mM Trinatriumcitrat
Hybridisierungs-Puffer:	5 x SSC; 2% (w/v) Blocking-Reagenz (Boehringer); 0,1% N-Lauroylsarkosin; 0,02% SDS

#### 3.5.4. DNA-Sequenzierung

„Bindesilan“-Lsg.:	50 µl Silan A-174 (Pharmacia) in 5 ml Ethanol und 1,2 ml Essigsäure;
TBE <sub>sequ.</sub> :	135 mM Tris; 131 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA

#### 3.5.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

PAGE-Probenpuffer:	33,3% β-Mercaptoethanol; 3,3% SDS; 13,3% Saccharose; 0,083% Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer:	0,05 M Tris; 0,38 M Glycin; 0,2% SDS
Coomassie-Färbelsg.:	0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva); 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250; 42,5% Ethanol; 5% Methanol; 10% Essigsäure
Entfärber:	10 % Essigsäure; 20 % Methanol

#### 3.5.6. Immunoblott

Semi-Dry-Blotting-Puffer:	25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 20% Methanol
Blockinglsg.:	3% BSA in H <sub>2</sub> O
TBS:	25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 137 mM NaCl
TBS-Tween:	TBS mit 0,1% (w/v) Tween 20
Substratpuffer für alk. Phosphatase:	100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
Ponceau S:	0,2%ige Ponceau S-Lsg. in 1%iger Essigsäure

#### 3.5.7. Proteinnachweis

Bradford-Reagenz:	100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 100 ml 85% (w/v) Phosphorsäure; 50 ml Ethanol; ad. 1 l dest. Wasser
-------------------	--

**3.5.8. Puffer für die Reinigung der Acetyltransferase aus *S. chrysomallus***

Alle Puffer wurden vor der Benutzung für 30 min entgast (Wasserstrahlvakuum).

<u>Puffer A:</u>	100 mM	Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0
	5% (w/v)	Glycerin
	10 mM	EDTA
	1 mM	DTE
	1 mM	PMSF
	1 mM	Benzamidin

Puffer B: Entspricht Puffer A, jedoch wurden die EDTA- bzw. DTE-Konzentrationen auf 5 mM bzw. 0,3 mM gesenkt.

Puffer C: Entspricht Puffer B, jedoch wurde die Kaliumphosphat-Konzentration auf 50 mM gesenkt und zusätzlich wurden 100 mM NaCl zugesetzt.

Puffer D: Entspricht Puffer C, jedoch wurde statt Kaliumphosphat, Tris-HCl (pH 8,0) verwendet.

**3.5.9. Puffer für die Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine**

<u>Puffer E:</u>	100 mM	Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0
	10% (w/v)	Glycerin
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
	1 mM	PMSF
	1 mM	Benzamidin

Puffer F: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
10% (w/v) Glycerin

**3.5.10. Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie**

Laufmittel I: isoPropanol : Ammoniak (25%), 7 : 3

Laufmittel II: isoPropanol : Essigsäure : Wasser, 7 : 3 : 2

### 3.6. Feinchemikalien

Alle Standardchemikalien, die nicht näher aufgeführt sind, wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid	BRL, Eggenstein
Acetyl-Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure	synthetisiert durch Hr. Dr. U. Keller
Agar	Oxoid, Wesel
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	USB, Bad Homburg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R 250 / G250	Serva, Heidelberg
L-2,4-Diaminobuttersäure	Sigma, Deisenhofen
DTE	Biomol, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	USB, Bad Homburg
Hefeextrakt	Difco, Detroit
IPTG	Biomol, Hamburg
Lambda-DNA	BRL, Eggenstein
Malzextrakt	Merck
Polyethylenglycol (PEG) 1000	Sigma, Deisenhofen
SDS	Fluka, Neu-Ulm
Tris	Biomol, Hamburg
X-Gal	Biomol, Hamburg

### 3.7. Radiochemikalien

[ $^{35}\text{S}$ ]-dATP $\alpha\text{S}$ , >1000 Ci/mmol	Amersham International
[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik, Braunschweig
[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-ddATP, 5000 Ci/mmol	Amersham International
[1- $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-Coenzym A, 59 mCi/mmol	Amersham International

### 3.8. Enzyme und Antikörper

AntiPentaHis Antikörper	Qiagen, Hilden
Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Katalase (Bovine Liver, 4190 units/mg Prot.)	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Sigma, Deisenhofen
RNase aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	GIBCO BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	GIBCO BRL Eggenstein
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, Bad Homburg
Klenow-Fragment	Amersham International

### 3.9. Kits

Thermo Sequenase cycle sequencing kit	Amersham International
DNA-3'-labeling Kit	Amersham International
Random-Primers DNA Labeling System	GIBCO-BRL, Eggenstein
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly
JETsorb-DNA Extraktionskit	GENOMED, Bad Oeynhausen

### 3.10. Säulenmaterialien

DEAE-Cellulose	Whatman, Maidstone
Elutip-D-Säulen	Schleicher & Schuell, Dassel
MonoQ, PC 1.6/5	Pharmacia Biotech, Upsala
Ni-NTA-Sepharose	Qiagen, Hilden
PD-10 Säule, Sephadex G-25M	Pharmacia Biotech, Upsala
Phenyl Superose HR 5/5	Pharmacia Biotech, Upsala
Ultrogel AcA54	Serva, Heidelberg
μRPC C2/C18 SC2.1/10	Pharmacia Biotech, Upsala

### 3.11. Membranen

Nylon-Membran: Hybond N	Amersham International
Nitrocellulose-Membran: Hybond-C extra	Amersham International
PVDF-Membran	Amersham International

### 3.12. Geräte

Agarosegelelektrophorese	Werkstatt, TU Berlin
DNA-Sequenzgelelektrophorese Modell L2	BRL, Eggenstein
Flüssigzintillationszähler Tri Carb 1600 CA	Packard
FPLC-Apparatur	Pharmacia, Freiburg
French Press Zelle	Aminco, Maryland, USA
HPLC-Anlage	Pharmacia, Freiburg
Smart-FPLC-Anlage	Pharmacia, Freiburg
Imaging-System Herolab E.A.S.Y. plus	Herolab, Wiesloch
Kühlzentrifuge Minifuge II	Heraeus Christ, Hanau
Kühlzentrifuge RC2-B	Sorvall, Bad Homburg
Microelisa Auto Reader	Dynatech, Denkendorf
Rotoren: GSA und SS34	Du Pont, Bad Homburg
SDS-PAGE-Mighty Small II	Hoefer Scientific, San Francisco
Semi-Dry-Blotter (FAST BLOT-Modell B34)	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer Modell 940	Kontron, München
Thermomixer Eppendorf 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler (UNO-Thermoblock)	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge Eppendorf 5412	Eppendorf, Hamburg
TLC-linear analyser „Tracemaster 20“	Berthold, Wildbach
Transilluminator Biometra TI 1	Biometra, Göttingen

## 4. Methoden

### 4.1. Anzucht von Mikroorganismen

#### 4.1.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte über Nacht in 2xYT-Medium (+Antibiotika) in einem Luftschüttler bei 37°C und 250 upm.

Zur längerfristigen Lagerung wurden Übernachtskulturen mit Glycerin (Endkonzentration: 20%) versetzt und bei -80°C gelagert.

#### 4.1.2. Kultivierung von *Streptomyces chrysomallus* X2

Für die Enzympräparation (DABA-Acetyltransferase) wurde *Streptomyces chrysomallus* X2 in HMM-Medium kultiviert. Dies geschah bei 30°C und 250 upm in einem Schüttelinkubator (New Brunswick G25) unter Verwendung von Erlenmeyerkolben (50 ml Medium je 300 ml Kolben), in denen sich zur besseren Sauerstoffanreicherung im Medium eine Edelstahlspirale befand. Nach einer Wachstumsdauer von 36 h wurden die Kulturen mit konzentrierter NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M versetzt und für weitere 4-8 h kultiviert.

#### 4.1.3. Kultivierung von *Streptomyces lividans*

*S. lividans* wurde in YEME-Medium (50 ml je 300 ml Kolben) angezogen. Die Inkubation erfolgte für 72 h bei 28°C und 250 upm in einem Schüttelinkubator (New Brunswick G25). Für die Stammsammlung wurden je 1 ml Kultur mit Glycerin (Endkonzentration: 20%) versetzt und bei -80°C gelagert.

Für die Protoplastenpräparationen wurde dem Medium eine 20%ige Glycin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,4% zugesetzt.

### 4.2. Methoden zur Isolierung von DNA

#### 4.2.1. Präparation chromosomaler DNA aus *Streptomyceten*

Die Präparation chromosomaler DNA aus Organismen der Gattung *Streptomyces* wurde aus 2 ml einer Flüssigkultur nach Hopwood *et al.* [1985] durchgeführt.

#### 4.2.2. Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* wurde aus einer 2 ml 2xYT-Übernachtskultur nach der Methode von Birnboim and Doly [1979] durchgeführt. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20°C oder 4°C in TE-Puffer.

#### 4.2.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Streptomyceten

Die Plasmidextraktion aus *Streptomyceten* erfolgte durch alkalische Lyse und Phenol/Chloroform Extraktion nach der Methode von Hopwood *et al.* [1985]. Als Ausgangsmaterial wurde entweder 2 ml einer Flüssigkultur oder 1 cm<sup>2</sup> Mycel von einer Agarplatte verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in TE-Puffer.

#### 4.2.4. Isolierung des Gens der Acetyltransferase (*thpA*)

##### 4.2.4.1. Cosmidgenbank von *S. chrysomallus*

Eine Cosmid-Genbank von *S. chrysomallus* in *E.coli* DH1 war von A. Haese und U. Keller unter Verwendung des pHC79 [Hohn und Collins, 1980] - Derivates pV34 konstruiert worden. Dazu wurde chromosomale DNA von *S. chrysomallus* mit *Sau3A* partiell verdaut und in den *Bam*HI geschnittenen Vektor kloniert. Die durchschnittliche Größe der Inserts lag bei 30 bis 40 kb [Collins *et al.*, 1984; Pahl *et al.*, 1992]. Zur nachfolgenden Transfektion mit dem Phagenlysat wurde *E. coli* DH1 eingesetzt.

##### 4.2.4.2. Koloniehybridisierungsscreening

Zur Isolierung des Acetyltransferasegens wurden ca. 30.000 *E.coli*-Cosmid-Klone der *S. chrysomallus* Genbank einer Koloniehybridisierung unterzogen. Dazu wurden die etwa stecknadelkopfgroßen *E. coli* Kolonien von den selektiven 2xYT-Platten auf Nylonmembranen transferiert [Sambrook *et al.*, 1989] und in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt (4.4.3.). Die Sonden für die Koloniehybridisierungen wurden von einer internen Peptidsequenz unter Beachtung des für Streptomyceten typischen Kodongebrauches abgeleitet (4.4.3.) [Wright and Bibb, 1992].

Insgesamt wurde bei 25 Kolonien der insgesamt 30.000 getesteten Klone ein Signal detektiert. Näher untersucht wurde anschließend das Cosmid cosAF1. Dieses ausgewählte Cosmid cosAF1 wurde durch Restriktionsendonukleasen kartiert und rehybridisiert. Die hybridisierenden Fragmente wurden subkloniert und anschließend sequenziert (4.3.3.).



### 4.3. Charakterisierung von DNA

#### 4.3.1. Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltungen von DNA erfolgten unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Eventuell vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNaseA Lösung (1 mg/ml) entfernt.

#### 4.3.2. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

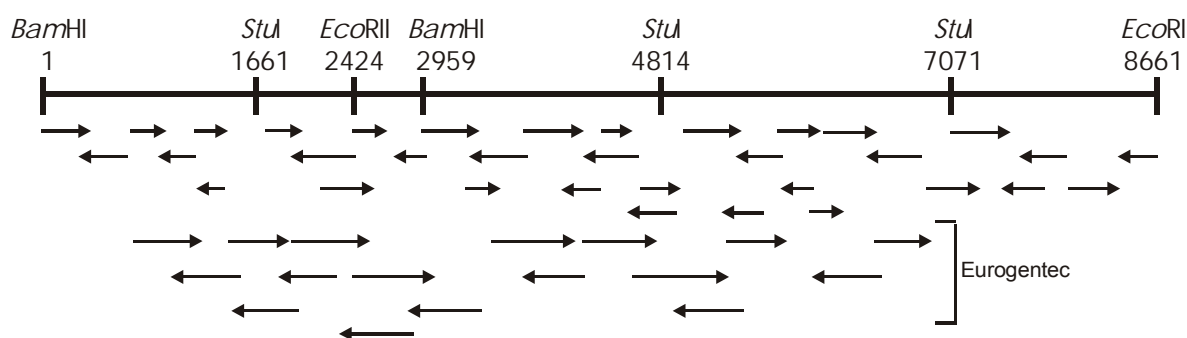
Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-flachbettgele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% und 2% eingesetzt. Das Gel enthielt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, um die DNA mit einem Transilluminator oder einer UV-Handlampe detektieren zu können. Als Gel- und Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke im Bereich von 20 bis 100 mA. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit  $1/10$  Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Größenstandard diente Lambda-DNA, die zuvor mit *Pst*I, gespalten wurde. Die Geldokumentation erfolgte mit dem E.A.S.Y. plus - Imaging-System von der Firma Herolab.

#### 4.3.3. Sequenzierung

Die Bestimmung von Nukleotidsequenzen wurde mit dem „Thermo Sequenase cycle sequencing kit“ der Firma USB-Amersham (Bad Homburg) durchgeführt. Zur Markierung der dabei entstehenden DNA-Fragmente diente [ $\alpha$ - $^{35}$ S]-dATP. Als Matrize wurden 500-1000 ng Plasmid-DNA (wie unter 4.2.2. beschrieben) eingesetzt, bei der jedoch die RNA durch eine RNase Behandlung entfernt wurde (50 µg/ml RNase, 20 min 37°C). Unmittelbar vor der Sequenzierungsreaktion wurde die Plasmid-DNA alkalisch denaturiert [Chen und Seeburg, 1985]. Dazu wurde die entsprechende Menge Plasmid-DNA in einem Volumen von 32 µl mit 8 µl Natronlauge (1 M) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 8 µl Neutralisierungslösung und 100 µl Ethanol für 15 min auf Eis. Nach dem Waschen des abzentrifugierten Pellets mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet bei 37°C getrocknet, wiederum auf 0°C abgekühlt und in 10 µl Wasser 15 min auf Eis resuspendiert. Die Sequenzierungsvorschrift des Herstellers wurde durch Zugabe von DMSO (5 % im Reaktionsansatz) modifiziert.

Die elektrophoretische Auftrennung der durch die Sequenzreaktion entstandenen und vor dem Auftragen auf das Gel für 10 min bei 70°C denaturierten DNA-Fragmente erfolgte mittels eines 6%igen Polyacrylamidgels (6% (w/v) Acrylamid; 0,33% (w/v) Bisacrylamid; 8 M Harnstoff, 0,1% (w/v) APS; 0,072% (v/v) TEMED; in TBE<sub>Sequ.</sub>) bei 60 W. Die Gele wurden angefertigt, indem die Gelmischung zwischen zwei durch 0,04 mm starke Abstandhalter (Gel-Blotting-Papier GB002, Schleicher & Schuell) getrennte Glasplatten gegossen wurde, wobei eine zuvor mit „Bindesilan“-Lösung behandelt wurde und die andere mit 1% Dimethyldichlorsilan (Pharmacia) in 1,1,1-Trichlorethan (Pharmacia). Dadurch blieb das Gel nach der Elektrophorese auf der mit Silan A-174 behandelten Platte haften und alle weiteren Schritte, wie das Fixieren (15 min in 10% Methanol; 15% Essigsäure), das Herauswaschen des Harnstoffs unter fließendem Wasser (ca. 30 min) sowie das Autoradiographieren (20 bis 96 h mit Röntgenfilm Konica NIF 100) nach dem Trocknen wurden mit dem sich auf der Glasplatte befindlichen Gel realisiert.

Die durch Sequenzierung zu analysierenden DNA-Fragmente wurden alle in den Vektor pTZ18U kloniert. Dadurch konnten für die Sequenzierungsreaktionen die handelsüblichen Universal cycle- bzw. reverse cycle Primer (3.3.) eingesetzt werden. Die verwendete Sequenzierungsstrategie ist in Abb. 5 gezeigt.



**Abb. 5: Sequenzierungsstrategie.**

Darüber hinaus wurde „Primer walking“ zum Schließen von Sequenzlücken, bzw. zum Sequenzieren über Anschlußschnittstellen von benachbarten Fragmenten benutzt. Dies wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) durchgeführt.

#### **4.3.4. Sequenzauswertung**

Die Auswertung der ermittelten Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes PC/Gene [Version 6.70 (1992); Moore *et al.*, 1988]. Für die Analyse des G+C-Gehaltes in der DNA und die Identifizierung der offenen Leserahmen anhand des Streptomycceten typischen Kodongebrauches wurde FRAME [Bibb *et al.*, 1984] sowie CODING2 (programmiert von F. Schauwecker 1997 auf der Grundlage von 17 Streptomycceten-Genen mit 5212 Kodons) verwendet. Die Datenbankrecherchen wurden mit FASTA [Pearson and Lipman, 1988] und den jeweils aktuellen Versionen der Datenbanken von SWISSPROT und EMBL durchgeführt. Zur Erstellung der Sequenzvergleiche diente CLUSTAL W [Thompson *et al.*, 1994] und GeneDoc [Nicolas und Nicolas, 1997].

### **4.4. Southern Hybridisierung**

#### **4.4.1. Markierung von DNA-Fragmenten**

Die Herstellung von  $^{32}\text{P}$ -markierten Hybridisierungssonden erfolgte unter Verwendung von  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ddATP mit dem DNA-3'-labeling Kit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers. Die Abtrennung von überschüssigen Nucleotiden erfolgte unter Verwendung von Elutip-D-Säulen (Schleicher & Schuell).

#### **4.4.2. Transfer von chromosomaler oder Plasmid-DNA auf eine Nylonmembran**

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde für 20 min in einer 0,25 M HCl Lösung depuriniert. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Inkubation in Denaturierungspuffer (30 min) und Neutralisierungspuffer (2 x 20 min). Der Transfer der DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond N) erfolgte mit 20xSSC in einem Kapillarblot. Nach 16-20 h wurde die transferierte DNA durch UV-Bestrahlung (302 nm, 40 Watt, 2 min, 12 cm Abstand) auf der Membran fixiert.

#### **4.4.3. Hybridisierung**

Alle Hybridisierungsexperimente wurden mit dem unter 3.5.3. beschriebenen Hybridisierungspuffer, der ohne die jeweilige Sonde als Prähybridisierungspuffer diente, durchgeführt. Die zu analysierende Nylonmembran wurde in eine

Hybridisierungsröhre (Biometra) überführt und mindestens 1 h bei 65°C im Rollofen prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde abgegossen und die unmittelbar zuvor denaturierte Sonde (170498A oder 170498B), 10 min im kochenden Wasserbad, zugegeben. Anschließend wurde über Nacht (14 bis 20 h) bei 65°C hybridisiert und die Membran dann einmal kurz sowie 2 x 30 min mit Waschpuffer bei 65°C gewaschen.

Die Detektion <sup>32</sup>P-markierter Sonden erfolgte durch Autoradiographie. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Konica NIF 100) zusammen mit der in Folie eingeschweißten Membran bei -80°C unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Cronex, Dupont) exponiert.

#### Zur Oligohybridisierung verwendete Oligonukleotide:

Die zur Detektion von der DABA-Acetyltransferase benutzten Oligonukleotide wurden von einer internen Peptidsequenz (Ke15P6) der aus *Streptomyces chrysomallus* gereinigten DABA-Acetyltransferase abgeleitet.

<b>Peptid Ke15P6:</b>	V	L	F	D	G	E	L	F	P	E	E	T....
<b>170498A:</b>	ttc gac ggc gag ctg ttc ccg gag gag acc											

<b>Peptid Ke15P6:.....E</b>	E	T	H	L	P	E	V	L	Y	R
<b>170498B:</b>	gag gag acc cac ctg ccg gag gtc ctg tac									

## 4.5. Klonierungsexperimente

### 4.5.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Technik der PCR wurde in dieser Arbeit zur Mutagenese von Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen zur Vorbereitung von Expressionskonstrukten eingesetzt.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

Template-DNA	100 bis 200 ng
Primer	je 50 pmol
DNTP's	200 µM
Vent Polymerase Puffer (10x)	10 µl
DMSO	10µl
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Vent Polymerase	2 U
<hr/>	
mit destilliertem H <sub>2</sub> O auf ein Gesamtvolumn von 100 µl	

Vor der Zugabe der Vent-Polymerase zum Reaktionsansatz wurde ein sogenannter „Hot Start“ (6 min bei 95°C) durchgeführt. Danach wurde der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt, die Polymerase zupipettiert und mit dem Reaktionszyklus begonnen. Die Zyklusbedingungen sind bei den einzelnen Plasmidkonstrukte angegeben. Abschließend wurde das PCR-Produkt durch eine Agarosegelelektrophorese mit anschließender Elution aus dem Gel gereinigt.

### 4.5.2. Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung von Plasmidvektor-DNA-Fragmenten wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch alkalische Phosphatase (Shrimp-Alkaline-Phosphatase) abgespalten. Die Durchführung der Dephosphorylierungsreaktion erfolgte nach der Standardvorschrift des Herstellers.

### 4.5.3. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Gesamtvolumen von 20-30 µl entweder 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die Ligation erfolgte mit 1 Unit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des Ligasepuffers des Herstellers.

#### 4.5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung eines präparativen Restriktionsansatzes wurde das entsprechende Agarosestück ausgeschnitten und die DNA aus der Agarose unter Verwendung des Jetsorb-Kits (Genomed) gereinigt.

#### 4.5.5. Transformation von *E. coli* Stämmen

Die Transformation wurde nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode von Cohen durchgeführt [Cohen *et al.*, 1972].

#### 4.5.6. Protoplastentransformation bei *Streptomyces*

Die Transformation bei *Streptomyces* erfolgte nach der Methode von Hopwood und Kieser [Hopwood *et al.* 1985; Kieser *et al.* 1982]. Nach der PEG1000 Trans-formation wurden die Protoplasten auf R5-Agarplatten überführt und nach einer Inkubationszeit von 16 h (30°C) mit einer Thiostreptonlösung (Endkonzentration: 25 µg/ml) überschichtet. Nach 3 Tagen wurden die Kolonien auf thiostreptonhaltige Agarplatten vereinzelt.

### 4.6. Heterologe Expression der *thp*-Gene in *E. coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde das „QIAexpress-System“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und nach den Protokollen des Herstellers verfahren. Der eingesetzte Expressionsvektor pQE30 besitzt zwischen dem Startkodon und dem Polylinker eine Sequenz, die sechs mal in Folge für die Aminosäure Histidin kodiert. Dadurch wird unter Kontrolle des T5-Promotors und zweier *lac*-Operator-Sequenzen (Induktion mit IPTG) das exprimierte Protein N-terminal mit einem sogenannten „Hexa-HIS-Schwanz“ fusioniert. Dies ermöglicht die Reinigung eines solchen Proteins an einer Nickelchelate-Affinitätsmatrix (Hochuli *et al.*, 1987).

Darüber hinaus wurde der Expressionsvektor pQE50 verwendet, bei dem die Nukleotidsequenz, die für die Hexa-His-Sequenz kodiert, fehlt.

Die Kontrolle der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte durch Sequenzierung des jeweils in pTZ18 klonierten PCR-Produktes.

Zur Überprüfung der Expressionsplasmide wurden die Konstrukte zunächst in JM109 (*lacI<sup>q</sup>*) transformiert. Zur Expression wurde *E. coli* M15 benutzt und bei 37°C oder 30°C kultiviert.



min 95°C; 1 min 55°C; 1 min 72°C) ausgehend von pAF1sub9 als Matrize mit den Primern FTHPC und RTHPC durchgeführt.

FTHPC (29-mer): 5'-CAA CCG GGA TCC GTG ATC GTC CGA TCG TT-3'

RTHPC (30-mer): 5'-TAC TTC GGT GGT CAT AAG CTT TCA GGC CTC-3'

Bei dem Plasmid pAF1sub9 handelte es sich um ein pTZ18-Derivat (Abb. 6).

Das 1275 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den pTZ18 Vektor kloniert. Anschließend wurde das Fragment gerichtet in pQE30 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert und in *E. coli* JM109 bzw. M15 transformiert. Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von VIVRS zu MRGSHHHHHHGSVIVRS verändert.

#### **4.6.1.4. pQE50thpC**

Die Konstruktion von pQE50thpC erfolgte analog zu der von pQE30thpC, wobei jedoch das PCR-Fragment gerichtet in pQE50 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert wurde. Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von VIVRS zu MCGSVIVRS verändert.

#### **4.6.1.5. pQE30thpD**

pQE30thpD ist ein pQE30-Derivat und diente der Expression von *thpD*. Zur Generierung von Schnittstellen wurde zunächst eine PCR (4.5.1; 35 Zyklen, 1 min 95°C; 90 sec 55°C; 65 sec 72°C) ausgehend von pAF1sub21 als Matrize mit den Primern FTHPD und RTHPD durchgeführt.

FTHPD (30-mer): 5'-GCC TGA GGA TCC ATG ACC ACC GAA GTA CGC-3'

RTHPD (27-mer): 5'-CCC GCC CGT GAA GCT TGC TAC TTC ACC-3'

Bei dem Plasmid pAF1sub21 handelte es sich um ein pTZ18-Derivat (Abb. 6).

Das 411 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den pTZ18 Vektor kloniert. Anschließend wurde das Fragment gerichtet in pQE30 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert und in *E. coli* JM109 bzw. M15 transformiert. Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von MTTEV zu MRGSHHHHHHGSMTTEV verändert.

#### **4.6.1.6. pQE50thpD**

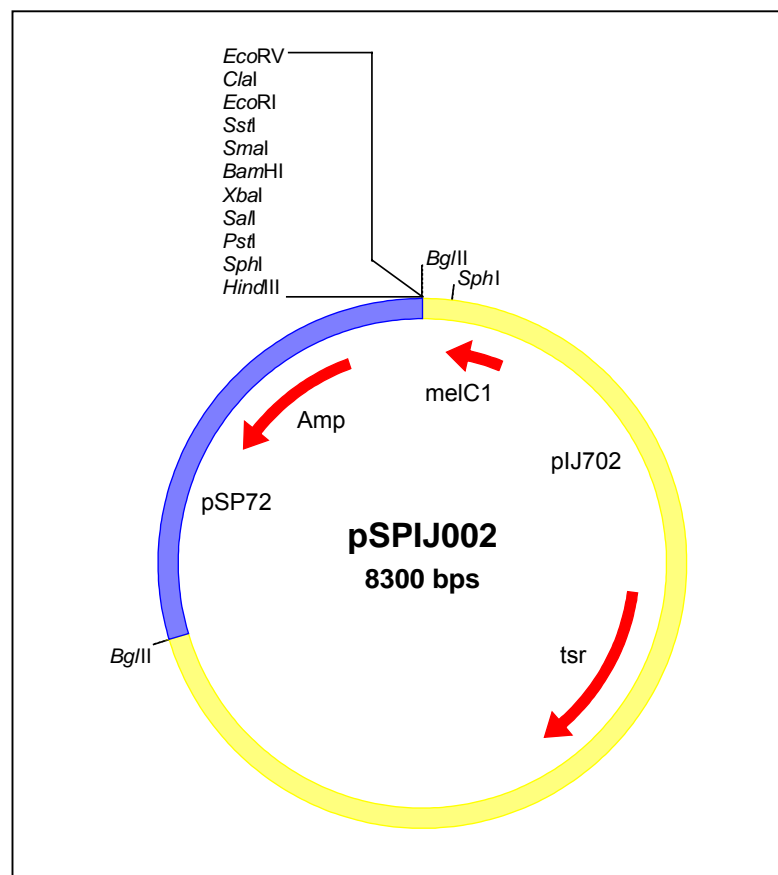
Die Konstruktion von pQE50thpD erfolgte analog zu der von pQE30thpD, wobei jedoch das PCR-Fragment gerichtet in pQE50 (*Bam*HI/*Hind*III) kloniert wurde.



Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von MTTEV zu MCGSMTTEV verändert.

#### 4.7. Expression der Gene *thpC* und *thpD* in *S. lividans*

Die heterologe Expression von Genen aus *S. chrysomallus* in anderen Organismen der Gattung *Streptomyces* wurde mit Hilfe des Vektors pSPIJ002 unter der Kontrolle des *mel*-Promotors realisiert [Katz *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1988]. Bei dem pSPIJ002-Vektor handelte es sich um einen Shuttle-Vektor, der für eine Expression sowohl in *E. coli* als auch in *Streptomyces* verwendet werden kann (Abb. 7).



**Abb. 7:** Shuttle-Vektor, der durch Ligation von pSP72 (*Bgl*II) und pIJ702 (*Bgl*II) entstanden ist. Dieser Expressionsvektor kann sowohl in *E. coli* als auch in *Streptomyces* verwendet werden.

Dieser Vektor entstand durch Ligation von pSP72 (*Bgl*II) und pIJ702 (*Bgl*II). Das Startkodon von *melC1* befindet sich im Bereich einer einmal im Plasmid vorkommenden *Sph*I-Schnittstelle, so daß eine Klonierung in den Leserahmen des *melC1* möglich ist.

#### 4.7.1.1. **pSPIJthpC**

pSPIJthpC ist ein pSPIJ002-Derivat und diente der Expression von *thpC* in *Streptomyces lividans*. Zur Generierung von Schnittstellen wurde zunächst eine PCR (4.5.1; 35 Zyklen, 1 min 95°C; 90 sec 55°C; 65 sec 72°C) ausgehend von pQE30thpC (4.6.1.3.) als Matrize mit den Primern FSPIJthp und RSPIJthp durchgeführt.

FSPIJthp (30-mer): 5'-GAG GAG GAA TTC AGC ATG CGA GGA TCG CAT-3'

RSPIJthp (25-mer): 5'-AGT CCA AGC TCA GCT AAT TAA GCT T-3'

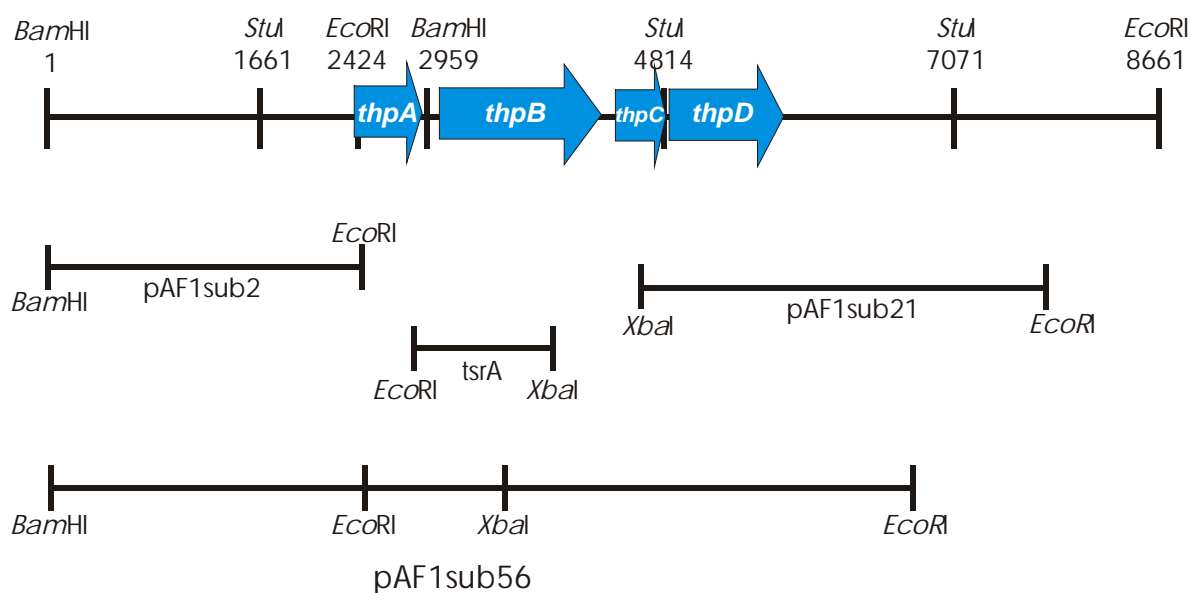
Das 426 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RI geschnitten und in pTZ18 kloniert. Anschließend wurde das Fragment gerichtet in pSPIJ002 (*Sph*I/*Hind*III) hinter den *melC1* Promotor kloniert und in *Streptomyces lividans* transformiert. Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von VIVRS zu MRGSHHHHHHGSVIVRS verändert.

#### 4.7.1.2. **pSPIJthpD**

pSPIJthpD ist ein pSPIJ002-Derivat und diente der Expression von *thpD* in *Streptomyces lividans*. Zur Generierung von Schnittstellen wurde zunächst eine PCR (4.5.1; 35 Zyklen, 1 min 95°C; 90 sec 55°C; 65 sec 72°C) ausgehend von pQE30thpD (4.6.1.5.) als Matrize mit den Primern FSPIJthp und RSPIJthp (6.6.2.1.) durchgeführt. Das 921 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RI geschnitten und in pTZ18 kloniert. Anschließend wurde das Fragment gerichtet in pSPIJ002 (*Sph*I/*Hind*III) hinter den *melC1* Promotor kloniert und in *Streptomyces lividans* transformiert. Der N-Terminus des resultierenden Genproduktes wurde dadurch von MTTEV zu MRGSHHHHHHGSMTTEV verändert.

#### 4.8. Insertionsinaktivierung

Für die Insertionsinaktivierung der Gene *thpA*, *thpB* und *thpC* wurde ein Konstrukt gewählt, in dem zwischen einem Fragment aus dem 5'-Bereich der entsprechenden Gene und einem zweiten Fragment aus dem 3'-Bereich eine Thiostrepton-Resistenzkassette (*tsrA*) kloniert wurde (Abb. 8). Hierzu wurden die Fragmente aus pAF1sub21 (*Xba*I/*Eco*RI) und *trsA* (*Xba*I/*Eco*RI) ligiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung wurde mit *Eco*RI über Nacht geschnitten. Dieses *Eco*RI Fragment wurde in das pTZ18-Konstrukt pAF1sub2 (*Eco*RI) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pAF1sub56 bezeichnet. Das mit *Hind*III linearisierte Plasmid pAF1sub56 wurde in *Streptomyces chrysomallus* wie unter 4.5.6 beschrieben, transformiert.

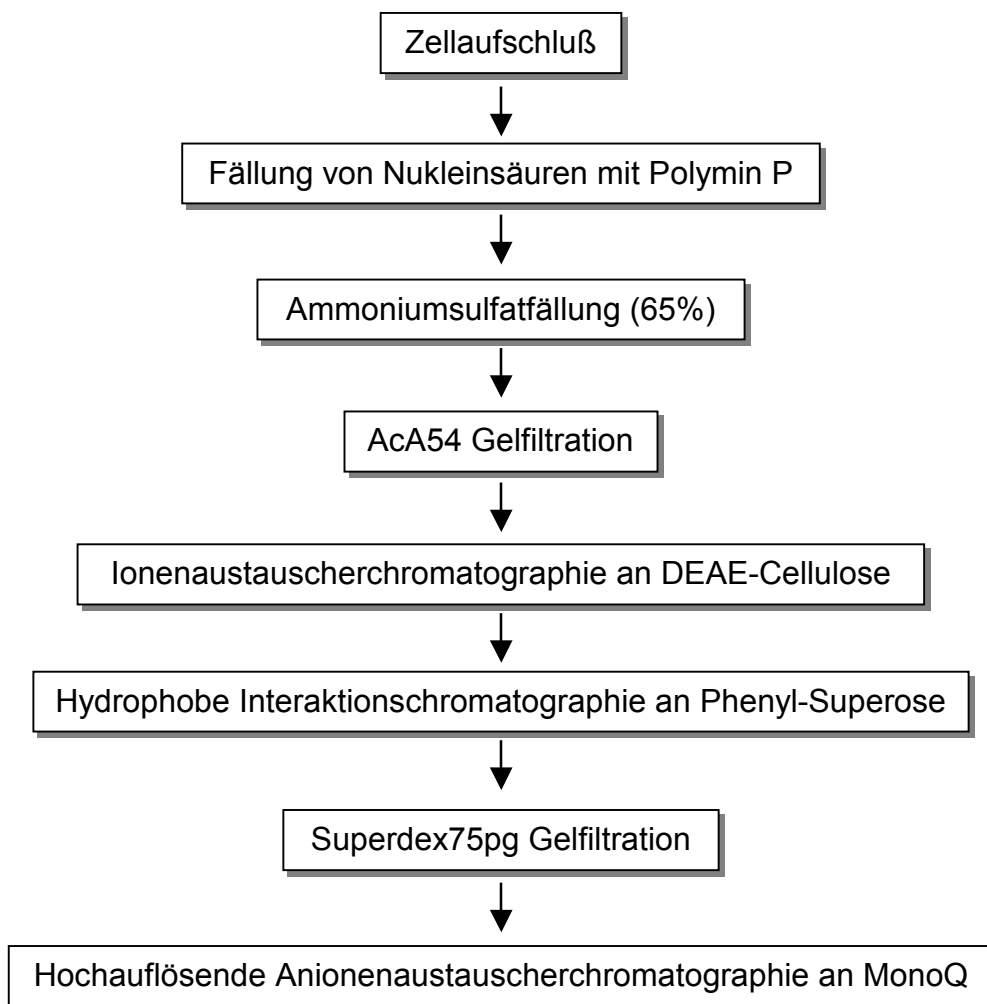


**Abb. 8:** Lage der Subklone, die für die Konstruktion des Insertionskonstrukts pAF1sub56 verwendet wurden. *tsrA*: Thiostreptonresistenzkassette.

## 4.9. Proteinchemische Methoden

### 4.9.1. Reinigung der DABA-Acetyltransferase aus *Streptomyces chrysomallus* X2

Die Reinigung erfolgte nach folgendem Schema:



Alle Operationen wurden bei 4°C durchgeführt.

Die DABA-Acetyltransferaseaktivität wurde auf den einzelnen Reinigungsstufen mit Hilfe des DTNB-Tests nachgewiesen (4.12.1.).

#### 4.9.1.1. Herstellung eines zellfreien Rohextraktes

30 bis 40 g Zellen (frisch geerntet oder bei -80°C gelagert) wurden im Verhältnis 1:5 (g/v) in Puffer A suspendiert und anschließend bei einem Druck von 14.000 psi durch eine French Press Zelle passagiert.

Das auf diese Weise gewonnene Zellhomogenat wurde mit einer Lösung von 1 mg/ml DNase I (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt. Außerdem wurde MgCl<sub>2</sub>

bis zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und 1 h gerührt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation des Homogenats im GSA-Rotor bei 4°C und 10.000 upm wurde das Präzipitat verworfen. Der Überstand wurde zur Fällung von Nukleinsäuren mit einer konzentrierten NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,4%) und einer 10%igen Polymin P Lösung (Endkonzentration 0,4%) versetzt.

#### **4.9.1.2. Ammoniumsulfatfällung**

Der zellfreie Rohextrakt wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Endkonzentration von 65% versetzt. Nach 2stündigem Rühren auf Eis wurde bei 12.000 upm 30 Minuten im SS34-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig (normalerweise nicht mehr als 10 ml) Puffer B gelöst.

#### **4.9.1.3. Gelfiltration über Ultrogel AcA54**

Das Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung von 0-65% wurde in Puffer B aufgenommen und anschließend an Ultrogel AcA54 fraktioniert. Die Ultrogel AcA54 Säule (55 cm x 4 cm) wurde zuvor mit Puffer B equilibriert.

#### **4.9.1.4. Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose**

Die Ultrogel AcA54 Fraktionen, bei denen eine DABA-Acetyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden auf eine DEAE-Cellulose-Säule (20 cm x 5 cm), die vorher in Puffer B equilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 500 ml Puffer B. Die DABA-Transacetylase eluierte bei 200 mM NaCl.

#### **4.9.1.5. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Superose**

Die Fraktionen der DEAE-Cellulose bei denen eine DABA-Acetyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und nach Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration 30% (w/v)) auf die Phenyl-Superose-Säule HR 5/5 aufgetragen. Die Elution erfolgte an einer FPLC-Anlage mit einem linearen Gradienten von 30 bis 0% Ammoniumsulfat in Puffer B. Die Elution der DABA-Acetyltransferase erfolgte bei 6,5% Ammoniumsulfat.

#### **4.9.1.6. Gelfiltration über Superdex75pg**

Auf eine in Puffer C equilibrierte HiLoad 16/60 Superdex75pg Säule wurden 1,5 ml Enzymlösung aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte an einer FPLC-Anlage mit einer Flußrate von 0,5 ml/min bei einer Fraktionsgröße von 2 ml. Die Elution der DABA-Acetyltransferase erfolgte nach 75 ml. Dies entspricht einer nativen Größe von ca. 20 kDa.

#### **4.9.1.7. Hochauflösende Anionenaustauscherchromatographie an MonoQ**

Fractionen der Superdex75pg-Gelfiltration, die eine DABA-Acetyltransferaseaktivität aufwiesen, wurden vereinigt und mit Puffer B im Verhältnis 1:3 verdünnt und auf eine MonoQ PC1.6/5 Säule (Smart-FPLC-Anlage) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0-300 mM NaCl in Puffer B eluiert. Die Flußrate betrug 100 µl/min. Es wurden Fractionen mit einem Volumen von 100 µl gesammelt. Die DABA-Acetyltransferase eluierte bei 250 mM NaCl.

#### **4.9.2. Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine aus *E. coli***

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 30°C für 10-14 h. Die Induktion wurde mit 0,2 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 durchgeführt. Die durch Zentrifugation geernteten Zellen (GSA-Rotor, 5.000 upm, 10 min, 4°C) wurde im Verhältnis 1:3 (w/v) in Puffer E resuspendiert und anschließend bei einem Druck von 10.000 psi durch eine French Press Zelle passagiert. Nach der Zentrifugation (SS34-Rotor, 14.000 upm, 30 min, 4°C) wurde das Präzipitat verworfen und der zellfreie Überstand weiter aufgearbeitet.

##### **4.9.2.1. Affinitätschromatographie an Nickelchelate-Matrix**

Für die Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose wurde das QIAexpress-System der Firma Qiagen verwendet und nach dessen Anleitung verfahren [Crowe und Henco, 1992]. Je 3 ml Säulenmaterial, welches eine Bindekapazität von 5 bis 10 mg HIS-fusionierten Proteins pro ml aufweist, wurde in eine Säule (Ø=1 cm) gefüllt. Auf die zuvor mit Puffer E equilibrierte Säule wurde der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Stufengradienten (30, 50, 100 mM Imidazol in Puffer E). Für die Aktivitätsbestimmungen wurden die einzelnen Fractionen auf einer SephadexPD10 Säule, equilibriert mit Puffer F, entsalzt.

#### 4.9.3. Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine aus *S. lividans*

Die Kultivierung von *Streptomyces lividans*, transformiert mit den entsprechenden Expressionsplasmiden, erfolgte wie unter 4.1.3. beschrieben. Die Reinigung der Hexa-His-Fusionsproteine wurde analog zu 4.10.1. durchgeführt.

### 4.10. Enzymatische Untersuchungen

#### 4.10.1. Bestimmung der Acetyltransferase-Aktivität

##### a) DTNB-Test:

Bei der Acetylierung von L-2,4-Diaminobuttersäure, die durch die Acetyltransferase katalysiert wird, entsteht CoA, welches mit DTNB (Ellmanns Reagenz) nach Smith quantifiziert wurde (Smith, 1981). Dabei kommt es zu einer Mercapto-Disulfid-Austauschreaktion zwischen der Disulfidbindung des DTNBs und der freigesetzten Thiolgruppe von CoA. Pro Mol CoA wird ein Mol CoA-TNB und ein Mol frei vorliegendes TNB gebildet. Die Bildung von TNB wurde durch die Absorptionsänderung bei 412 nm gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt 70 µl Enzymlösung (frei von Thiolreagenzien wie DTE), 0,1 mmol AcCoA, 1 mmol DTNB und 5 mmol L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Als Referenz dienten Ansätze, bei denen DABA durch Puffer ersetzt wurde. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur in Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Absorptionsänderung bei 412 nm gemessen. Für die kinetischen Messungen wurde die DABA Konzentration auf 25 mmol bzw. die AcCoA Konzentration auf 1 mmol erhöht.

##### b) Acetylierung von DABA unter Verwendung von [1-<sup>14</sup>C]Acetyl-Coenzym A:

In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden 0,1 mmol AcCoA, 0,1 µCi AcCoA, 2,5 mmol DABA für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde auf einer Kieselgelplatte (Kieselgel-60, Merck) in den Laufmitteln I und II chromatographiert. Die Detektion von radioaktiv markierten Produkten erfolgte durch Autoradiographie.

#### **4.10.2. Bestimmung der Substratspezifität des THPA-Hexa-His-Fusionsproteins**

Für die Substratspezifität des THPA-Hexa-His-Fusionsproteins wurde der unter 4.10.1.b beschriebene Test verwendet. Die Konzentrationen der Substrat-aminosäuren betrugen jedoch 25 mmol und die von AcCoA 2,5 mmol. Die eingesetzte Proteinmenge betrug pro Ansatz 15 µkat Hexa-His-Fusionsprotein. Die Auftrennung der Produkte erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) in Laufmittel II. Der Nachweis erfolgte durch Autoradiographie. Die Quantifizierung der einzelnen Produkte erfolgte durch Integration der Peakflächen, die mit Hilfe des TLC-Scanners gemessen wurden.

#### **4.10.3. Bestimmung der AcDABA-Cyclase Aktivität**

Für die Bestimmung der AcDABA-Cyclase-Aktivität wurden verschiedene Menge an Hexa-His-THPC-Fusionsprotein aus *E. coli* M15 bzw. *S. lividans* in Gegenwart von 10 mmol N-γ-AcDABA für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Das verwendete N-γ-AcDABA wurde zum einen durch chemische Synthese und zum anderen enzymatisch durch Umsetzung von AcCoA, DABA und Hexa-His-THPA-Fusionsprotein erhalten (4.10.1.). Durch Verwendung von <sup>14</sup>C-markiertem AcCoA bei der enzymatischen Synthese stand darüber hinaus <sup>14</sup>C-markiertes N-γ-AcDABA zur Verfügung. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) in Laufmittel I und II. Die Analyse der Produkte erfolgte durch Ansprühen der Kieselgelplatten mit Dragendorff-Reagenz oder bei Verwendung von <sup>14</sup>C-markiertem N-γ-AcDABA durch Autoradiographie.

#### **4.10.4. Bestimmung der Aktivität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins**

Für die Hydroxylierung von THP(B) zu THP(A) wurden 5 mmol α-Ketoglutarat, 5 mmol THP(B), 5 mmol Ascorbinsäure und 1 mmol FeSO<sub>4</sub> in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 30°C für eine Stunde inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch Chromatographie an einer NH<sub>2</sub>-Nucleosil-HPLC-Säule mit einem isokratischen Gradienten von 70% Acetonitril bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Elution der Substanzen wurde anhand der Extinktion bei 210 nm verfolgt.



#### **4.10.5. Substratspezifität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins**

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l 25 mmol Prolin bzw. Picolinsäure, 5 mmol  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5 mmol Ascorbinsäure, 1 mmol FeSO<sub>4</sub> und 2 mg/ml Hexa-His-THPD-Fusionsprotein bei 30°C für eine Stunde inkubiert. Die Auftrennung der Produkte erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck) in Laufmittel II. Die Analyse der Produkte erfolgte durch Ansprühen der Kieselgelplatten mit Ninhydrin-Lösung.

#### **4.10.6. Stabilitätsbestimmung des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins**

Zur Bestimmung der Stabilität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins wurden die Reaktionsansätze, die 10 mM THP(B) und 2 mg/ml Hexa-His-THPD-Fusionsprotein enthielten, unterschiedlich lang bei 30°C bzw. bei 0°C präinkubiert. Nach bestimmten Präinkubationszeiten wurden den Ansätzen 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5 mM Ascorbinsäure und 1 mM FeSO<sub>4</sub> zugesetzt. Die weitere Inkubation wurde für eine Stunde bei 30°C durchgeführt. Der Nachweis des sich gebildeten THP(A) erfolgte analog zu 4.10.4.

### **4.11. Protein Nachweisverfahren**

#### **4.11.1. Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976). 10  $\mu$ l einer Proteinlösung wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 100  $\mu$ l Bradford-Reagenz versetzt. Die Proben wurden dann in einem ELISA-Reader bei 570 nm vermessen. Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen einer BSA-Lösung.

#### **4.11.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteingemischen wurde in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Gelelektrophoresen wurden mit 10%igen oder 15%igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proteinproben wurden durch Zugabe von PAGE-Probenpuffer im Verhältnis von 3:1 und anschließendem Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker dienten die Marker SDS-7 (Markerproteine 14, 20, 24, 29, 36, 45, 66 kDa) der Firma Sigma und der LMW-

Marker (Markerproteine 14,4; 20,1; 30; 43; 67; 94 kDa) der Firma Pharmacia. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine 30 min in Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde anschließend durch Waschen mit Entfärber entfernt.

#### **4.11.3. Semi-Dry-Blotting**

Der Transfer, der durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, erfolgte auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C) nach dem „Semi-Dry-Verfahren“. Die Western-Blot-Analyse wurde nach einem modifizierten Standardprotokoll der Firma Schleicher und Schuell durchgeführt [Schleicher & Schuell, 1995]. Dabei wurde nur ein Puffer (Semi-Dry-Blotting-Puffer) verwendet. Der zum Blotten angelegte Strom betrug bei einer Blotdauer von 35 min (DABA-Acetyltransferase) bzw. 45 min (Hexa-His-THPD-Fusionsprotein) 4 mA/cm<sup>2</sup>. Die Membran wurde entweder mit Ponceau S gefärbt oder für eine Immunreaktion verwendet (4.11.4.).

#### **4.11.4. Immunofärbung**

Die Immunfärbung wurde nach einem Standardprotokoll der Firma Schleicher und Schuell durchgeführt (Schleicher & Schuell, 1995). Als primärer Antikörper diente der PentHisAntikörper (Qiagen), der in einer Verdünnung von 1:3000 in Blockinglösung eingesetzt wurde. Zur Detektion wurde ein Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma), 1:30000 in TBS verdünnt, verwendet. Der Blot wurde durch Zugabe von NBT (0,25 mg/ml) und BCIP (0,15 mg/ml) in Substratpuffer entwickelt.

### **4.12. Proteinfragmentierung und N-terminale Sequenzierung**

#### **4.12.1. Tryptischer im Gel-Verdau der DABA-Acetyltransferase**

Der enzymatische Verdau der DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus* mit Trypsin wurde nach der SDS-PAGE der SmartMonoQ Fraktion 21 (4.9.1.7.) im Gel durchgeführt. Hierzu wurde die mit Coomassie gefärbte Proteinbande aus dem Gel ausgeschnitten und 2 h mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde der restliche Farbstoff durch zweimaliges Waschen mit 50% Acetonitril (v/v) in 100 mM Ammoniumcarbonat-Puffer pH 8,1 entfernt. Durch Aufnehmen in 1 ml Acetonitril wurden die Gelstücke in 5 min geschrumpft. Nach Entfernen des

Acetonitrils wurden 1 µg Trypsin (gelöst in 20 µl 100 mM Ammoniumcarbonat-Puffer pH 8,1) hinzugegeben. Sobald die Gelstücke den zugegebenen Puffer aufgenommen hatten, wurden sie mit 100 µl 100 mM Ammoniumcarbonat-Puffer pH 8,1 überschichtet und 36 h bei 37°C inkubiert. Die Extraktion der Peptide erfolgte zweimal mit 100 µl 70 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O und zweimal mit 50% (v/v) TFA in Acetonitril (je 30 min Inkubation bei 37°C). Die vereinigten Extrakte wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 100 µl Eluent A (0,1% TFA (v/v) in H<sub>2</sub>O) aufgenommen. Die Auftrennung der Peptide erfolgte mit Hilfe einer Smart-FPLC-Anlage an einer µRPC SC2.1/10 Säule mit einem linearen Gradienten von 0-85 % Eluent B (0.1 % TFA (v/v) in Acetonitril). Die Flußrate betrug 100 µl/min. Die Peaks wurden separat gesammelt.

#### **4.12.2. N-terminale Sequenzierung der DABA-Acetyltransferase**

Von der Hauptfraktion der letzten Reinigungsstufe (MonoQ) wurden 40 µl auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen. Nach der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Protein auf eine PVDF-Membran nach dem „Semi-Dry-Verfahren“ geblottet (40 min 4 mA/cm<sup>2</sup>; s. 4.11.3.). Nach dem Blotten wurde die Membran 3 x 15 min mit Wasser gewaschen und anschließend mit Ponceau S gefärbt. Die N-terminale Sequenzierung des geblotteten Proteins erfolgte an einem Protein-Mikrosequencer der Firma Applied Systems (freundlicherweise durchgeführt von Frau Giesela Haeselbarth). Die durch den Trypsin-Verdau erhaltenen Peptidfraktionen, die von der NH<sub>2</sub>-Nucleosil-HPLC-Säule eluierten, wurden zur Trockene eingengt. Die N-terminale Sequenzierung erfolgte bei diesen Peptiden direkt nach dem Resuspendieren in 50% Methanol/Wasser.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Isolierung und Charakterisierung der L-2,4 Diaminobuttersäure-Acetyltransferase aus *Streptomyces chrysomallus*

#### 5.1.1. Nachweis der L-2,4 Diaminobuttersäure-Acetyltransferase in *Streptomyces chrysomallus*

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Protein- oder Gensequenzen von Enzymen oder Genen der Ectoin-Biosynthese bekannt. Es wurde daher beschlossen, zur Auffindung der THP(B)-Biosynthesegene die L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (DABA-Acetyltransferase) (siehe Abb. 4) aus *S. chrysomallus* zu isolieren und partiell zu sequenzieren. Aus den erhaltenen Proteinsequenzen sollten dann Oligonukleotide abgeleitet werden, die für das Screening einer Cosmidbank eingesetzt werden sollten.

Wie erwartet, wurde die Anwesenheit einer DABA-Acetyltransferase-Aktivität in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -fraktionierten Zellextrakten von *Streptomyces chrysomallus* festgestellt (4.9.1.2.). Die dünnschichtchromatographische Analyse von Reaktionsmischungen zeigte die Bildung von N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure ( $\gamma$ -AcDABA) aus radioaktivem AcCoA und L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA). Die Identifizierung des radioaktiven Produkts erfolgte durch Vergleich mit dem durch chemische Synthese erhaltenem Referenzmaterial. Aus Abb. 9 ist zu erkennen, daß in Anwesenheit von DABA eine zusätzliche Bande, mit gleichem  $R_f$ -Wert wie das authentische  $\gamma$ -AcDABA, auftritt. In Abwesenheit von DABA wird diese Verbindung nicht gebildet.

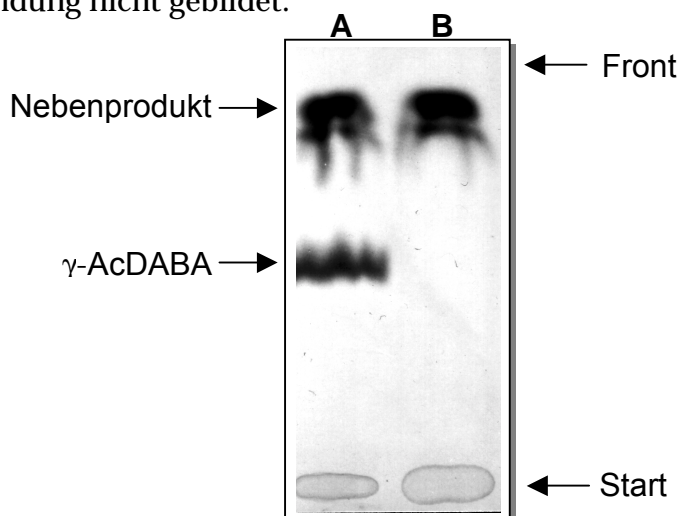


Abb. 9: Autoradiogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung eines Reaktionsgemisches, das  $^{14}\text{C}$ -AcCoA, DABA und (A)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fraktionierter Rohsaft von *S. chrysomallus* bzw. (B) Puffer D enthält. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C. Laufmittel II wurde verwendet.

Die Aktivitätsmenge an Enzym, die aus *S. chrysomallus*-Zellen unter diesen Bedingungen erhalten wurde, war zu gering, um einen präparativen Reinigungsgang zu etablieren. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe Keller haben gezeigt, dass die Enzymaktivität durch Salzschock während der Kultivierung zusätzlich induziert werden kann (Abb. 10). Kulturen von *S. chrysomallus* wurden daher nach 36 h Wachstum in HMM-Medium mit konzentrierter NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,5 M) versetzt. Mycelium aus solchen Kulturen, welche nach 4 bis 8 Stunden nach dem Salzschock geerntet und aufgearbeitet wurden, enthielten einen bis zu 15fach erhöhten Gehalt an DABA-Acetyltransferase-Aktivität. Interessanterweise stellt *S. chrysomallus* nach dem Salzschock das Wachstum ein, begleitet von teilweiser Lyse der Zellen, im Gegensatz zu anderen Streptomyceten wie z.B. *S. parvulus*.

Die Induktion der DABA-Acetyltransferase-Aktivität in den Zellen wurde auch nach Zugabe anderer Osmolyte wie Saccharose (ca. 0,5 M) oder Glycerol festgestellt.

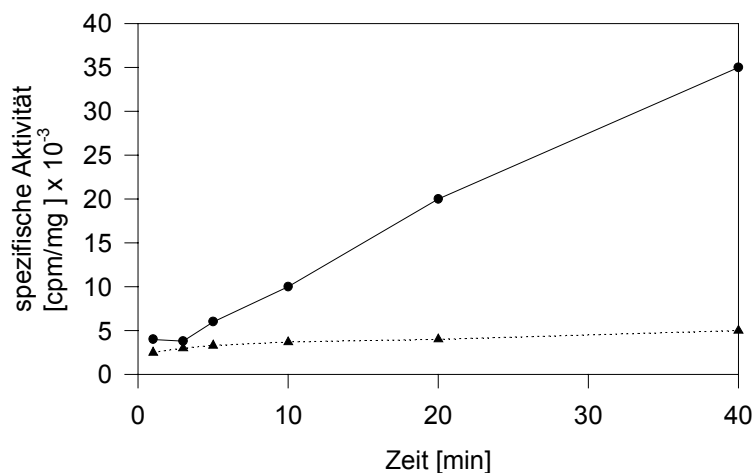


Abb. 10: Zeitverlauf der Bildung von  $\gamma$ AcDABA in zellfreien Extrakten von *S. chrysomallus* ohne Salzschock (.....) und nach 4,5 stündigem Salzschock (—) gemessen nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der Reaktionsmischung in Laufmittel II und Bestimmung der eingebauten Radioaktivität.

### 5.1.2. Reinigung der DABA-Acetyltransferase

Die DABA-Acetyltransferase-Aktivität wurde basierend auf dem DTNB-Test (4.10.1.) in sechs Schritten 186fach, mit einer Ausbeute von 7%, gereinigt.

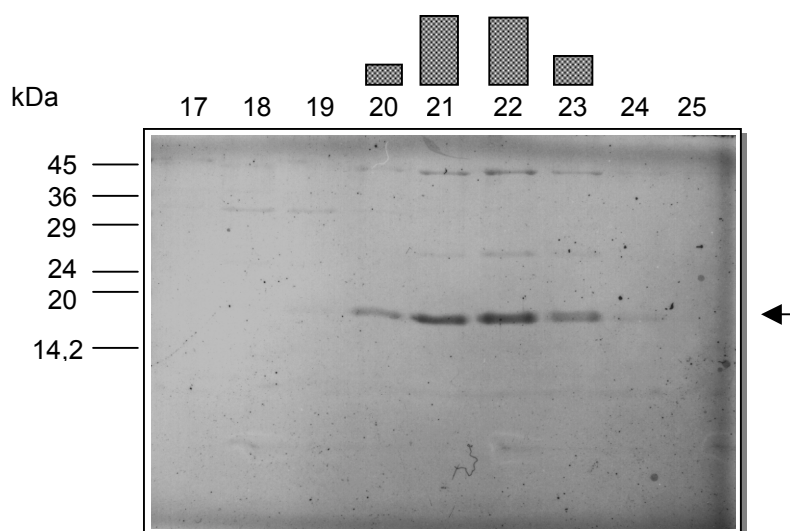
Die Reinigung erfolgte nach dem in Tabelle 1 gezeigten Schema:

**Tab 1: Reinigung der DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus***

Ein Unit entspricht der Menge Enzym, die 1  $\mu\text{mol}$  Acetyl-Coenzym A pro Sekunde in  $\gamma$ -N-Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure konvertiert. Die Reinigung erfolgte wie in 4.9.1. beschrieben.

Reinigungsschritt	Volumen ml	Protein mg	Units $\mu\text{kat}$	spez. Aktivität $\mu\text{kat}/\text{mg}$	Ausbeute %	Reinigung
Zellextrakt	330	3100	417	0,13	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fällung	44	2200	396	0,18	95	1,4
AcA54 Gelfiltration	178	320	334	1,04	80	8
DEAE Cellulose	160	48	231	4,28	55	33
Phenylsuperose	24	14	103	7,35	25	57
Superdex75	17	3,4	64	18,8	15	145
Smart-MonoQ	4	1,2	29	24,2	7	186

Die gelelektrophoretische Analyse der letzten Aufreinigungsstufe zeigte mehrere Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel. Die Identität der DABA-Acetyltransferase konnte aber durch Zuordnung des koordinierten Auftretens einer bestimmten Proteinbande ( $M_r$  17,000) in den Fraktionen mit Enzymaktivität bei der Smart-MonoQ-Chromatographie ermittelt werden (Abb. 11).



**Abb. 11: 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) mit DABA-Acetyltransferase enthaltenen Fraktionen aus dem letzten Reinigungsschritt (Smart-MonoQ, siehe Tabelle 1). Der Enzymnachweis erfolgte mit dem DTNB-Test (4.10.1.). Die hypothetische DABA-Acetyltransferase ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.**

### 5.1.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz der DABA-Acetyltransferase

Von der Hauptfraktion der Smart-MonoQ-Reinigungsstufe in Abb. 11 wurden ca. 10 pmol auf eine PVDF-Membran geblottet und der aminoterminalen Mikrosequenzierung durch Edman-Abbau unterworfen. Es wurde die folgende Sequenz ermittelt: T A A P A D F A R A R S E F L S (I)\* D A P R.

Da von dieser Proteinsequenz, infolge der Kodonvariabilität, nur eine sehr degenerierte Oligonukleotidsequenz abgeleitet werden konnte, wurden zusätzliche interne Peptidsequenzen der DABA-Acetyltransferase bestimmt (s. 5.1.4).

### 5.1.4. Bestimmung von internen Peptidsequenzen der DABA-Acetyltransferase

Zur Bestimmung interner Peptidsequenzen wurde der Hauptteil der Fraktion 21 (Abb. 11) einer präparativen SDS-Gelelektrophorese unterzogen und nach der Anfärbung direkt im Gel mit Trypsin verdaut. Nach Elution der Peptidfragmente aus dem Polyacrylamidgel wurden diese mittels Smart-HPLC an  $\mu$ RPC SC 2.1/10 getrennt. Als Referenz diente ein Ansatz, bei dem ein Gelstück, welches kein Protein enthielt, in gleicher Weise aufgearbeitet wurde. Verschiedene Fraktionen, die definierte Peptide enthielten, wurden durch Edman-Abbau ansequenziert. Hierbei wurden folgende Sequenzen erhalten:

**Tab. 2: Interne Peptidsequenzen der DABA-Acetyltransferase, die durch einen tryptischen im Gel-Verdau erhalten wurden und davon abgeleiteten Oligonukleotidsequenzen.**  
Die N-terminale Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau.

Peptid	Ermittelte interne Sequenzen der DABA-Acetyltransferase
Ke15P6	V L F D G E L F P E E T (H)* L P E V L Y (R)*
Ke16P4	V E D G A A I
Ke17P2	F A A T S A

Von der Peptidsequenz Ke15P6 wurden die folgenden Oligonukleotidsequenzen abgeleitet:

**Peptid Ke15P6:** V L F D G E L F P E E T....  
**170498A:** ttc gac ggc gag ctg ttc ccg gag gag acc

**Peptid Ke15P6:** .....E E T H L P E V L Y R  
**170498B:** gag gag acc cac ctg ccg gag gtc ctg tac

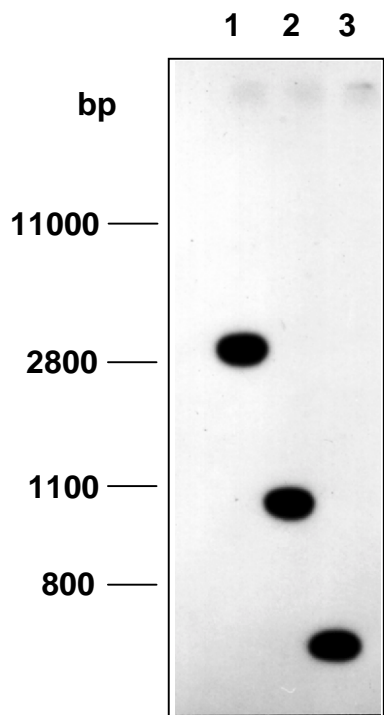
\*) Die in Klammern gesetzten Aminosäuren der sequenzierten Peptide konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

## 5.2. Klonierung der DABA-Acetyltransferase

Eine Cosmid-Genbank von *S. chrysomallus* in *E. coli* DH1 wurde mit den  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden 170498A und 170498B durchgemustert, die von der internen Peptidsequenz Ke15P6 der gereinigten DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus* abgeleitet wurden (5.1.4.). Insgesamt wurden etwa 30.000 *E. coli* Kolonien, deren Cosmidinsert eine durchschnittliche Größe von ca. 35 kb hatte, durch Koloniehybridisierung untersucht. Das bedeutet, daß etwa 1.050.000 kb chromosomaler DNA bearbeitet wurden. Bei einer Genomgröße von ca. 8.000 kb entspricht das einer, statistisch gesehen, 130fachen Überpräsentation des *S. chrysomallus*-Chromosoms. Bei der Durchmusterung von 30.000 Kolonien wurden insgesamt 25 Cosmid-Klone, die eine Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde 170498A zeigten, identifiziert. Von diesen wurde das als cosAF1 bezeichnete Cosmid für weitere Untersuchungen ausgewählt. Mit der Oligonukleotidsonde 170498B erfolgten unter diesen stringenten Bedingungen keine Hybridisierungen.

### 5.2.1. Analyse von Cosmid cosAF1

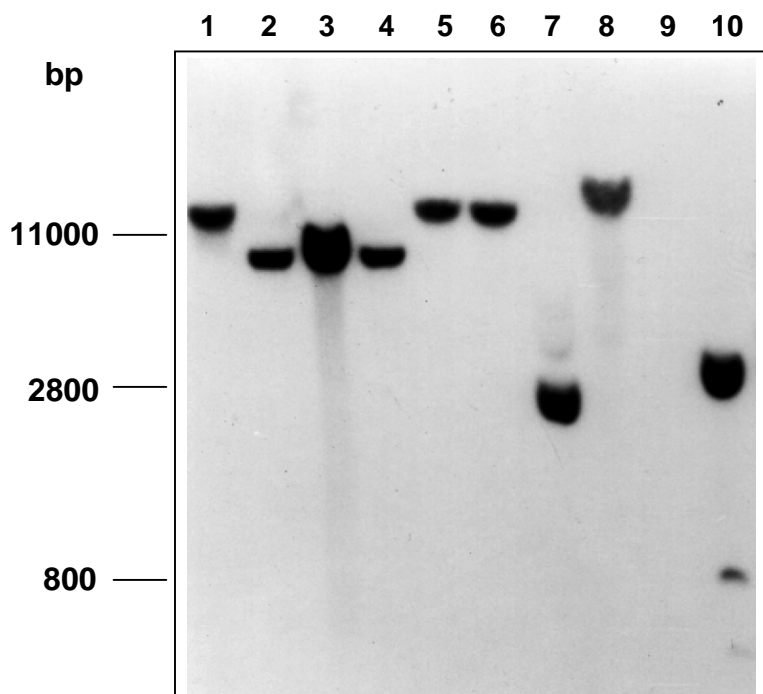
Der mit der Oligonukleotidsonde 170498A hybridisierende Bereich aus cosAF1 wurde durch Restriktions- und Hybridisierungskartierung eingegrenzt (Abb. 12). Ein 2,9 kb großes *Bam*HI-Fragment aus cosAF1 wurde in pTZ18 subkloniert und im erhaltenen Plasmid pAF1sub1 sequenziert.



**Abb. 12: Southernanalyse von cosAF1 mit der Sonde 170498A.** Gezeigt ist das Autoradiogramm einer Southernanalyse. Jeweils 1  $\mu\text{g}$  DNA wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: *Bam*HI, Spur 2: *Sal*I und Spur 3: *Bam*HI + *Eco*RI

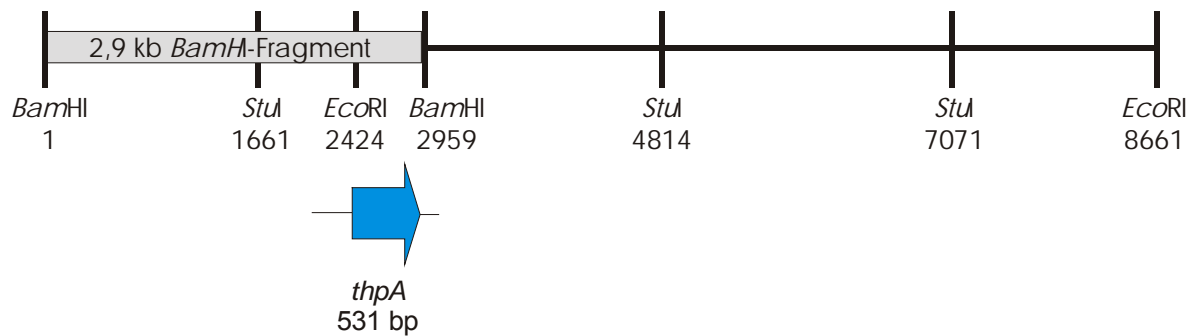


Um sicherzustellen, daß das Cosmid cosAF1 ein authentisches Fragment aus dem *S. chrysomallus* Genom trägt, wurden zur Kontrolle Southernanalysen mit chromosomaler DNA von *S. chrysomallus* mit der Oligonukleotidsonde 170498A durchgeführt. Es hybridisierte jeweils eine einzelne Bande. Diese verschiedenen einzelnen hybridisierenden chromosomalen Restriktionsfragmente, u.a. das 2,9 kb große *Bam*HI-Fragment, entsprachen in ihrer Größe den entsprechenden hybridisierenden Fragmenten von cosAF1 (Abb. 12 und 13). Dies zeigt, daß der klonierte Bereich im Cosmid kontinuierlich zusammenhängend ist und vom Chromosom des *S. chrysomallus* stammt.



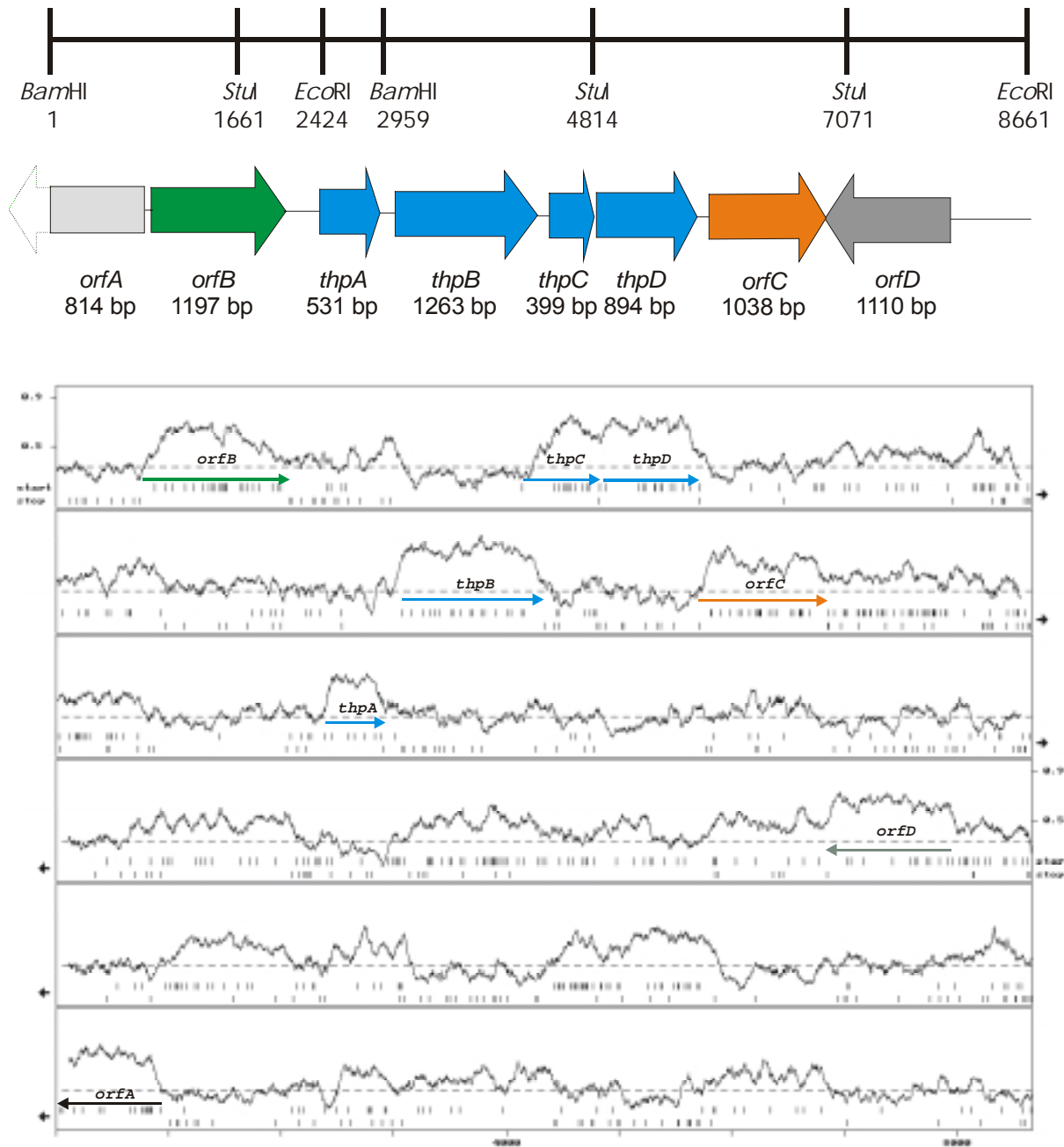
**Abb. 13: Southernblotanalyse von chromosomaler DNA aus *S. chrysomallus* mit der Sonde 170498A. Gezeigt ist das Autoradiogramm der Southernanalyse.** Jeweils 2 µg chromosomaler DNA wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1: *Bgl*II, Spur 2: *Bgl*II+*Eco*RI, Spur 3: *Eco*RI, Spur 4: *Eco*RI+*Pst*I, Spur 5: *Pst*I, Spur 6: *Pst*I+*Hind*III, Spur 7: *Sal*I, Spur 8: *Cl*aI, Spur 9: Marker λ*Pst*I, Spur 10: *Bam*HI

Basierend auf den Southernanalysen und den verschiedenen Restriktionsanalysen des Cosmids cosAF1 wurde dann folgende Restriktionskarte, des mit der Oligonukleotidsonde hybridisierenden Bereichs, aufgestellt (Abb. 14).



**Abb. 14: Restriktionskarte des mit der Sonde 170498A hybridisierenden Bereichs sowie angrenzender Regionen des Cosmids cosAF1.** Das hybridisierende 2,9 kb große *Bam*HI Fragment ist als grauer Balken dargestellt. Die Lage von *thpA*, dem hypothetischen Gen der DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus*, die durch spätere Sequenzierung ermittelt wurde, ist durch einen Pfeil symbolisiert.

Ausgehend von dieser Karte wurde der Bereich zwischen der *Bam*HI-Schnittstelle (Basenposition (bp) 1) und der *Eco*RI-Schnittstelle (bp 8661) sequenziert. Hierbei wurden die Randbereiche von der Basenposition 1 bis 450 und von der Basenposition 6900 bis 8666 nur einzelsträngig sequenziert. Diese Sequenzierung ergab das Vorhandensein von acht offenen Leserahmen (ORF) (Abb. 15). Die Lokalisierung von offenen Leserahmen in dieser Abbildung beruht auf der Auswertung der Nukleotidsequenz des sequenzierten Cosmidabschnittes.



**Abb. 15: Restriktionskarte des Cosmids cosAF1 sowie die Lage der durch Sequenzierung aufgefundenen offenen Leserahmen.**

Unter den Restriktionsenzymen ist die entsprechende Basenposition angegeben. Die Bereiche von Basenposition 1 bis 400 sowie von 6900 bis 8666 wurden z.T. nur einzelsträngig sequenziert. Die ORFs sind durch Pfeile symbolisiert. Die Phasenanalyse erfolgte nach Wright und Bibb [1992].

### 5.3. Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen

Für den doppelsträngig sequenzierten 6,5 kb Abschnitt von cosAF1 und den z.T. einzelsträngigen Randbereichen wurde die in Abbildung 16 gezeigte DNA Sequenz bestimmt. Diese DNA weist im kodierenden Bereich einen für Streptomycceten typischen G+C-Gehalt von 70,7% auf, wobei der G+C-Gehalt in der dritten Kodonposition auf 93,6% ansteigt. Dies begründet sich aus dem für Streptomycceten hohen G+C-Gehalt und den daraus resultierenden Kodon-gebrauch [Wright und Bibb, 1992].

```

5' I G A D Y A A R V T D Y R R D Y L Q R M H A
3' GGATCCCGGCGTCGTACGCGGCGCGCACGGTGTCTAGCGGCGGTCTGACAGCTGCCGCATATGCG 66
   CCTAGGGCCGCGAGCATGCGCCGCGCGTGCCACAGCATCGCCGCCAGCATGTGCGACGGCGTATACGC

   S W R P F R A E G G A A L D P F T A I N V L
   CCGACCAGCGGGGAACCTGGCCTCGCCGCCCGCGCGAGATCGGGGAACGTGGCGATGTTGACCA 132
   GGCTGGTGCCTCCCTTGGACCGGAGCGGCGGGCGGCGCTCTAGCCCCTTGACCCGCTACAACCTGGT

   T P V I A V G R E A F L P I T D E T L G T A
   GCGTCGGGACGATCGCCACCCCCGCTCGGCGAAGAGCGGGATGGTGTCTCTCGGTGAGGCCGGTGG 198
   CGCAGCCCTGCTAGCGGTGGGGGGCGAGCCGCTTCTCGCCCTACCACAGGAGCCACTCCGGCCACC

   H E I C D I G A E V L D T L S E E A F C H A
   CGTGCTCGATACAGTCGATGCCCCGCTCCACCAGGTCTGGTGAGCGACTCCTCGGCGAAACAGTGCG 264
   GCACGAGCTATGTCAGCTACGGGCGGAGGTGGTCCAGCCACTCGCTGAGGAGCCGCTTTGTACGCG

   T V R A G L R H A E A I A A E V E G R P W C
   CGGTGACGCGGGCGCCGAGCCGGTGCGCCTCGGCGATGGCCGCTCGACCTCGCCGCGCGGCCAGC 330
   GCCACTGCGCCCGCGGCTCGGCCACGCGGAGCCGCTACCGGCGGAGCTGGAGCGGCGCGCCGGTTCG

   A T L D G A D R D I W D G V L K V W G D G R
   AGGCGGTTCAGGTCCCCGGCGTTCGCGGTTCGATCCAGTCCCCACCAGCTTGACCCAGCCGTCCCCGC 396
   TCCGCCAGTCCAGGGGCCGAGCGCCAGCTAGGTTCAGGGGGTGGTTCGAAGTGGGTTCGGCAGGGGCG

   R A E R A V Y A V L D G P E I E H A Y N R I
   GCCGGGCTCCCGGGCCACGTACGCGACGAGGTGCGCGGGTTCGATCTCATGGGCGTAGTTGCGGA 462
   CGGCCCGGAGGGCCCGGTGCATGCGCTGCTCCAGCGGCCCAAGCTAGAGTACCCGCATCAACGCCT

   Y R R T R A I H R G A R I I K P L D E R D D
   TGTCAGCGGCGGGTCTTGGCGATGTGGCGGCCGGCCCTGATGATCTTCGGAAGGTCTCGCGGTTCGT 528
   ACATCGCCGCCAGGACCGCTACACCGCCGGCCGGGACTACTAGAAGCCTTCAGGAGCGCCAGCA

   I W R T D S P S G A D R I L L T G A E R D T
   CGATCCACCGGTGTCTGGAGGGCGATCCCGGTCCCGGATCAGCAGGGTTCGGGCTCCCGGTTCGG 594
   GCTAGGTGGCCACAGCCTCCCGCTAGGGCGCAGGGCCTAGTCGTCCCAAGGCCGAGGGCCAGCC

   L A Q K E A T A A D V P G H R D L G V H C H
   TGAGCGCTGCTTCTCGGCGGTTCGCCGCTCGACCGGGCCGTGCCGGTCCAGGCCACATGGCAGT 660
   ACTCGCGGACGAAGAGCCGCCAGCGGCGCAGCTGGCCCGGCACGGCCAGGTCCGGGTGTACCGTCA

   A D V L G P L A W G R V T V A R D A G P P R
   GCGGTCGACCAAGTCCGGGCGAGCGCCACCCCTGACCGTCCCGCGCGGTTCGGCGCCGGGCGGCC 726
   CGCGCAGCTGGTCAGGCCCGTTCGCGGGTGGGGGACTGGCAGTGGCGCGCCAGCCGCGGCCCCGCGG

```

E Y T I R G G V A W L E D R V E D P G V L V  
GCTCGTAGGTGATCCGCCCCGACGGCCACAGTTCGTCCCGCACCTCGTCCGGGCCGACGAGCA 792  
CGAGCATCCACTAGGCGGGCGGGTGCCGGGTGTCAAGCAGGGCGTGAGCAGGCCCGGCTGCTCGT

R G K V R L fM <-*orfa*  
CCCCGCCCTTCACCCGCAGCACCCGCTGCTCTCTCTCTGATCACTCATACGCGGCACTGTACGAGGCC 858  
GGGCCGGAAGTGGGCGTGTGGGCGACGAGGAGGACTAGTGAGTATGCGCCGTGACATGCTCCGG

*orfb*-> fM D V P A A R P E G G N V S P  
GTCGGTAGGCTGCTGGGGCCCGTGGACGTTCCCGCCCGCCCGGAAGGCGGAACGTTTCACCG 924  
CAGCCATCCGACGACCCCGGG.....

A P A H G P A N D P E E S P T V T H P F L D  
GCGCCTGCCCATGGACCCGCGAACGACCCCGAAGAGAGCCCCACCGTGACGCACCCCTTCTCTCGAC 990

L P P L T A D H F A A I E R R V A R L L A T  
CTCCCCCGCTCACCGCCGACCACTTCGCGGCGATCGAGCGGCGCGTGGCCCGGCTCCTCGCCACG 1056

E Q D V V I T Q G E A L L P L E G C I R G G  
GAGCAGGACGTGTCATCACCCAGGGCGAGGCGCTGCTGCCGCTGGAGGGCTGCATCCGCGGCGGC 1122

A R P G S T A L N V V T G P Y G Q T F G N W  
GCACGGCCCGGCTCGACCGCGCTGAACGTGGTCACCGGCCCGTACGGGCAGACCTTCGGCAACTGG 1188

L R D C G A E V V D L T V P F H A A V T A D  
CTGCGGGACTGCGGCGCCGAGGTGCTCGACCTCACGGTGCCGTTCCACGCGCGGTACCGCCGAC 1254

Q V A E A L A A H P G I D F V S L V H A E A  
CAGGTGCGCGAGGCGCTCGCCGCGCACCCGGGGATCGACTTCGTCTCGCTGGTGCACGCGGAGGCG 1320

A T G N T N P V A E I G E V V R A H G A L F  
GCGACCGGCAACACCAACCCGGTTCGCGGAGATCGGCGAGGTGGTCCGGGCGCACGGCGCGCTGTTT 1386

M L D A V A S V G A E P L L P D A W G V D L  
ATGCTGGACGCGGTTCGCTCGGTGGGCGCCGAGCCGCTGCTGCCGGACGCCTGGGGCGTTCGACCTG 1452

C V I G A Q K A M G G P A G V S A V S V S A  
TGCGTGATCGGCGCGCAGAAGGCCATGGGCGGGCCCGCCGGGGTGTGCGCGGTGTCGGTGAGCGCG 1518

R A W E R I A A N P A A P R R S Y L S L L D  
CGGGCTGGGAGCGGATCGCCGCCAACCCGGCCGCCCGCGCGCTCCTACCTCTCCCTCCTGGAC 1584

W K E R W I D G G R T A L P H A P A Q L E M  
TGGAAGGAGCGCTGGATCGACGGCGGCCGCACGGCGCTGCCGCACGCCCCGGCGCAGTTGGAGATG 1650

L G L E A C V A R I E D E G L D T V T A R H  
CTGGGCCTGGAGGCCTGCGTGGCGCGGATCGAGGACGAGGGCCTGGACACGGTGACGGCCCGCCAC 1716

A S A A A A T R A G A V A L G G G L E P Y V  
GCCTCGGCCCGCGCGGCCACCCGGGCCGGTTCGCGTGGCCCTGGGCGGCGGGCTGGAGCCGTACGTC 1782

H E A R D A A P V A T T L R A P A G T D A A  
CACGAGGCGCGGGACGCGGCCCGGTGGCGACGACGCTGCGTGCCCCGGCGGGGACGGACGCGGCC 1848

A L V A A A L A A D P A L P L V A G G G A L  
GCGCTGGTTCGCGGCGGCGCTGGCGGCGGACCCCGCGCTGCCGCTCGTCGCGGGCGGTGGGGCGCTG 1914

S K E M I R V N H Y G A D A T R G A V L S S  
TCCAAGGAGATGATCCGGGTCAACCATTACGGGGCGGATGCGACGCGGGGCGCGGTGCTGTCTCTCG 1980

L A A L G A V L T D A G R R V D I E A A R R CTCGCGGCTCTGGGGGCGGTGCTGACCGATGCCGGCCGGCGGGTCGATATCGAGGCTGCCCCGTAGG	2046
A V S E T W P S L * GCTGTTTCGGAAACCTGGCCGAGCCTCTGATATTCTCATGCGGAAAGCTGCTTTATTGAAAAGCA	2112
GCTTCCCACATTCTTCTGCCCCGCTTTCCCGTCACCTAAACGGGCCAGTTTTTTCTGGCCGCGAACT	2178
TCATGATTTCGGACACATCTCGCGAGAGTTACAACCCTGTGACCGACTCCACAGGGTCGGATTATGC -----><-----	2244
CCGAAAAATTTCAGGACAAAGTGCAGGAAAATGCACCTGAATCACCGGGAACCTCGCGCACGCCTGA	2310
TAACACAAAGAAGCCCTCCACCCAACCCTCTACGTGCGATGCAATTTTCGAAATTTGCTGGGTAAATT -35 -10	2376
<b>thpA</b> -> M T A A P A D F A R A R S E F L S I D CAATTGCGATGACCGCCGCACCAGCAGATTTTGCCCGTGCCCGAAGCGAATTCCTCAGTATCGATG	2442
A P R V E D G A A I W R I A R D S Q V L D L CGCCACGAGTGGAGGACGGAGCCGCGATCTGGCGCATAGCCCGCGACTCCCAGGTCCTGGACCTGA	2508
N S S Y S Y L L W C R D F A A T S A V A R G ACTCCTCGTACAGCTACCTGCTGTGGTGCCGTGACTTCGCCGCGACCTCCGCCGTCGCCCCGTGGCG	2574
E N G E P I A F V T G Y V R P D R P Q T L V AGAACGGCGAGCCCATCGCCTTCGTGACGGGCTACGTGAGGCCCCGACCGCCCCCAGACCCTCGTCG	2640
V W Q V A V D Q A H R G K G L A A A L L D A TCTGGCAGGTGGCCGTCGACCAGGCCCACCGCGGCAAGGGGCTGGCCGCCGCTCTGCTGGACGCAC	2706
L T A R V A A D Q V L S S V E T T I T P D N TGACCGCCCGGGTCGCCGCCGACCAGGTCCTGTGCTCCGTGGAGACGACGATCACGCCGGACAACA	2772
T A S D R L F T S Y A Q R H D V A L E K E V CCGCCTCCGACCGGCTGTTACGTCTACGCCCAGCGCCACGACGTGCGCTGGAGAAGGAAGTGC	2838
L F D G E L F P E E T H L P E V L Y R I G P TCTTCGACGGCGAGCTGTTCCCCGAAGAGACGCACCTGCCCGAGGTGCTCTACCGGATAGGCCCCGT	2904
F A T * TCGCCACCTGAGCCGCCCCGGCCACCGCACCCCGGCGTACCCGACCCGTACGCCGGATCCCCCTGA	2970
CTTATCGCGCCGACCGACCACTCGGCGCGGTCCCGGCCGACCCGTGCGGGCGGGGAGCACTCGACC	3036
<b>thpB</b> -> fM T I T P P A L S V ACTGCCCCGTACACCCCCCTCACGAGGAGATCCGCTGTGACCATCACCCCGCCCGCCCTGAGCGT	3102
F E T L E S E V R S Y C R G W P A V F D R A CTTCGAGACCCTGGAGTCCGAGGTACGGAGCTACTGCCGCGGCTGGCCCGCCGTGTTTCGACCGCGC	3168
Q G A R L T D E D G H S Y L D F F A G A G S GCAGGGCGCCCGGCTGACCGACGAGGACGGCCACTCCTACCTGGACTTCTTCGCCGGGGCCGGCTC	3234
L N Y G H N N P V L K R A L I D Y I E R D G GCTCAACTACGGCCACAACAACCCGGTGCTGAAACGAGCGCTGATCGACTACATCGAGCGCGACGG	3300
I T H G L D M A T T A K R A F L E T F Q N V CATACCCACGGCCTGGACATGGCGACCACCGCCAAGCGGGCGTTTCTGGAGACGTTCCAGAACGT	3366
I L R P R D L P Y K V M F P G P T G T N A V GATCCTGCGGCCGCGCGATCTGCCGTACAAGGTGATGTTCCCCGGCCCCGACCGGCACCAACGCCGT	3432

E S A L K L A R K V K G R E S V V S F T N A  
CGAGTCGGCGCTGAAGCTGGCCCGCAAGGTCAAGGGCCGCGAGTCGGCGTCTCGTTACCAACGCT 3498

F H G M S L G S L A V T G N A F K R A G A G  
CTTCCACGGCATGTCGCTGGGCTCGCTCGCGGTGACCGGGAACGCGTTCAAGCGGGCCGGGGCCGG 3564

I P L V H G T P M P F D N Y F D G T V P D F  
TATCCCGCTGGTCCACGGCACCCCGATGCCGTTTCGACAACTACTTCGACGGCACGGTCCCCGACTT 3630

L W F E R L L E D Q G S G L N K P A A V I V  
CCTCTGGTTTCGAGCGGCTCCTCGAGGACCAGGGCTCCGGAATCAACAAGCCCGCAGCCGTGATCGT 3696

E T V Q G E G G I N V A R A E W L R A L Q E  
GGAGACCGTCCAGGGCGAGGGCGGCATCAACGTGCGCCGCGCCGAGTGGCTGCGCGCGCTCCAGGA 3762

L C L R Q V M L L I V D D I Q M G C G R T G  
GCTCTGCCTCCGCCAGGTCATGCTGCTGATCGTCGACGACATCCAGATGGGCTGCGGCCGACCCG 3828

G F F S F E E A G I V P D I V T L S K S I S  
CGGCTTCTTCTCCTTCGAGGAGGCCGGCATCGTCCCGGACATCGTCACGCTCTCCAAGTCCATCAG 3894

G Y G L P M S L C L F K P E L D I W E P G E  
CGGCTACGGCCTGCCCATGTCCCTCTGCCTCTTCAAGCCCAGCTGGACATCTGGGAGCCCGGCGA 3960

H N G T F R G N N P A F V T A A A V L D A Y  
GCACAACGGCACCTTCCGCGGCAACAACCCGGCCTTCGTACGGCCGCGCCGCTGCTCGACGCTA 4026

W A D G Q M E K Q T L A R G E Q V E Q T L L  
CTGGGCCGACGGCCAGATGGAGAAGCAGACCCTCGCCCGCGGCGAACAGGTGGAACAGACCCTGCT 4092

A I C A E E P T A Q F R G R G L V W G M E F  
CGCCATCTGCGCCGAGGAGCCGACCGCGCAGTTCCGCGGCCGGGGCCTGGTGTGGGGCATGGAGTT 4158

E D K A R A S A V C A R A F E L G L L L E T  
CGAGGACAAGGCGCGCGCCTCGGCGGTCTGCGCCGCGCCTTCGAGCTGGGGCTCCTCCTGGAGAC 4224

S G P Q S E V V K L L P P L T I T P E E L D  
CTCGGGCCCGCAGAGCGAGGTGCTCAAGCTGCTGCCGCCGCTGACCATCACCCCCGAAGAGCTGGA 4290

E G L R T L A R C V R E T A \*  
CGAGGGCCTGCGCACGCTGGCCCGCTGCGTCCGCGAAACGGCCTGACCCGGCACTGCCGGGGCAGG 4356

-----> <----- *thpC*->  
CGGAGAAGAGAGGTCCCGGGCCGCGAGGCCCGGGACGCTGTACAGAGA GAAAGGCAACCGCTCACC 4422

fM I V R S F S D I E N T D R H V K A A S G T  
GTGATCGTCCGATCGTTTCAGTGACATCGAGAACACCGACCGGCATGTGAAGGCGGCATCCGGCACC 4488

W E S K R I V L A K E K V G F S L H E T V L  
TGGGAGAGCAAGCGCATCGTGCTCGCCAAGGAGAAGGTGGGCTTCTCGCTCCACGAGACCGTGCTG 4554

Y A G T E T S M W Y A N H I E A V L C T E G  
TACGCGGGCACGGAGACCTCCATGTGGTACGCGAACCACATCGAGGCGGTGCTGTGCACCGAGGGC 4620

E A E L T N D E T G E T H W I T P G T M Y L  
GAGGCCGAGCTACCAACGACGAGACCGGCGAGACGCACTGGATCACGCCGGGCACCATGTACCTG 4686

L D G H E R H T M R P K T D F R C V C V F N  
CTGGACGGGCATGAGCGGCACACCATGCGGCCCAAGACCGACTTCCGCTGCGTGTGTGTTCAAC 4752

P P V T G R E D H D E N G V Y P L L T E E A  
CCCCCGTACGGGACGGGAGGACCATGACGAGAACGGTGTCTACCCACTGCTGACCGAGGAGGCC 4818

\* *thpD*-> M T T E V R A D L Y P S R G A A E M T  
TGAACCACCATGACCACCGAAGTACGCGCCGATCTGTACCCCTCGCGCGGCGCCGCCGAGATGACC 4884

T P R Q D P V I W S A P G A P G P V A A K D  
ACTCCCCGCCAGGACCCGGTCATCTGGTCCGCGCCGGGCGCACCGGGTCCGGTCGCCGCCAAGGAC 4950

L Q G Y E H D G F L T V D Q L I A P D E V A  
CTCCAGGGATACGAGCACGACGGCTTCCTCACCGTCGACCAGCTCATCGCCCCGACGAGGTGCGC 5016

V Y Q A E L N R L I S D P A V R A D E R S I  
GTCTACCAGGCGGAGCTGAACCGGCTGATCTCCGACCCGGCGGTCCGCGCCGACGAGCGCTCGATC 5082

V E K Q S Q N V R S V F E V H R I S E V F A  
GTCGAGAAGCAGTCGCAGAACGTACGGTCCGTCTTCGAGGTCCACCGGATCAGCGAGGTCTTCGCC 5148

G L V R D E R V V G R A R Q I L G S D V Y V  
GGTCTGGTCCGCGACGAGCGGGTGGTGGGCCGGGCCCCGCCAGATCCTCGGCTCGGACGTGTACGTC 5214

H Q S R I N V K P G F G A T G F Y W H S D F  
CACCAGTCCCGGATCAACGTGAAGCCGGGCTTCGGGGCCACGGGCTTCTACTGGCACTCGGACTTC 5280

E T W H A E D G L P N M R T V S V S I A L T  
GAGACCTGGCACGCGGAGGACGGTCTGCCGAACATGCGGACGGTGTCCGTGTGATCGCGCTGACC 5346

E N F D T N G G L M I M P G S H K T F L G C  
GAGAACTTCGACACCAACGGCGGGCTGATGATCATGCCCGGTTTCGCACAAGACGTTCTTCGGCTGC 5412

A G E T P K D N Y K K S L Q M Q D A G T P S  
GCGGGCGAGACGCCGAAGGACAACCTACAAGAAGTCGCTCCAGATGCAGGACGCCGGCACCCCGTCC 5478

D E A L T K M A D R H G I R L F T G R A G S  
GACGAGGCGCTGACGAAGATGGCCGACCGCCACGGCATCAGGCTCTTCACGGGCAGGGCCGGTTCG 5544

A T W F D C N A M H G S G D N I T P Y A R S  
GCGACCTGGTTCGACTGCAACGCCATGCACGGCTCGGGCGACAACATCACCCCGTACGCGCGCAGC 5610

N V F I V F N S V E N A A Q E P F A A P I R  
AACGTCTTCATCGTCTTCAACAGCGTGGAGAACGCGGCCAGGAGCCCTTCGCGGCTCCGATCCGC 5676

R P E F I G A R D F T P V K \* <-----  
CGCCCCGAGTTCATCGGGGCGGGGACTTCACCCCGGTGAAGTAGCGGGCCGCACGGGCGGGAAGG 5742

----->  
GCCGGGACGGGTACGCCGTCCCGGCCCTTCCCGGGTAACCTCGCTGGACCGGGGCCGGGTCAGCGGA 5808

*orfC*-> M T S H V R H I T I D C A D A Y A L  
GAGGGTGTCCGCCATGACTTCCCATGTACGTACATCACGATCGACTGCGCCGACGCCTACGCGCT 5874

G G F W A Q V L G A P L S D E D F P G D P E  
CGGCGGCTTCTGGGCCCAGGTGCTCGGCGCGCCGCTCTCCGACGAGGACTTCCCCGGCGATCCGGA 5940

A L V E A P G A A I L F V R V D E K K Q T K  
GGCTCTGGTTCGAGGCTCCCGGCGGGCGATCCTCTTCGTCCGGGTGGACGAGAAGAAGCAGACCAA 6006

N R V H L D I Q P Q D R S R D E E V E R L L  
GAACCGCGTCCATCTGGACATCCAGCCGCAGGACCGCTCCCGGGACGAGGAGGTGGAGCGGCTGCT 6072



A L G A T L V G D H R R P N G R G W A T L A CGCGCTCGGCGCGACCCCTGGTGGGCGACCACCGCAGGCCGAACGGGCGCGGCTGGGCGACGCTCGC	6138
D P E G N E F C V E C S A A E R A A L T G T CGATCCCGAGGGCAACGAGTTCTGTGTGGAGTGCTCCGCCCGGAGCGGGCGGCGCTCACCGGGAC	6204
R L P V T A D D V T S A V R L A V D V L A G CCGGCTGCCGGTGACCGCCGACGATGTGACCTCGGCGGTGCGGCTCGCGGTGGACGTGCTGGCCGG	6270
A P A D R W D A P A G S L D W T C W E T V E AGCCCCGGCGGACCGCTGGGACGCGCCCCGCGGAAGCCTCGACTGGACCTGCTGGGAGACGGTGGA	6336
H L S D D L F A Y A V Q L G P R T P P L D R GCACCTGAGCGACGATCTGTTTCGCTTACGCCGTGCAGTTGGGACCCCGTACGCCTCCGCTGGACCG	6402
D V P Y R W A P E R Q G G P Y N A V F A D R GGACGTGCCCTACCGGTGGGCGCCCCGAACGGCAGGGCGGGCCCTACAACGCGGTCTTCGCCGACCG	6468
D A G P A G L L A T L E A S G A L L A S M A TGATGCCGGTCCCGCCGGGCTGCTGGCCACGCTGGAGGCGAGCGGGGCGCTGCTGGCCTCGATGGC	6534
R T T P P E V R S Y H G Y G I S D P E G F A GCGGACGACGCCGCCCGAGGTGCGCTCGTACCACGGGTACGGGATCTCCGACCCGGAGGGCTTCGC	6600
A M G V V E T L V H T Y D L A E G L G L D W CGCGATGGGCGTGGTGGAGACCCTGGTGCACACGTACGACCTCGCCGAGGGCCTGGGGCTGGACTG	6666
S P S P A L C D R V L A R L F P D A P A G G GTCGCCGTCCCCGGCCCTCTGCGACCGGGTGCTGGCCCCGCTCTTCCCGGACGCCCCGGCGGGCGG	6732
D R W T V L L W A T G R A E L P D H P R R T CGACCGGTGGACCGTCCTTTTGTGGGCCACCGGCCGCGCCGAGCTGCCGGACCAACCGCGCCGTAC TCGACGGCCTGGTGGGCGCGGCATG	6798
S W R W D G R P R E D A Q T E S S A G * CTCGTGGCGGTGGGACGGGAGGCCGCGCGAGGACGCTCAGACGGAGTCGAGCGCCGGGTAGTCGGT GAGCACCGCCACCCTGCCCTCCGGCGCGCTCCTGCGAGTCTGCCTCAGCTCGCGGCCCATCAGCCA * V S D L A P Y D T	6864
GTAGCCCTTGGCGTCGCCGCCGAAGAAGGTCGACGGGTGCGGGGTGTTGAACGGGCCGCCCGCCTT CATCGGGAACCGCAGCGGCGGCTTCTTCCAGCTGCCAGCCCCACAACCTTGCCCGGCGGGCGGAA Y G K A D G G F F T S P D P T N F P G G A K	6930
CAGCCGGGCGGGCAGGTCCGGGTTGGCGAGGAAGAGCGCCCCGTAGGAGATCAGGTGCGCGATGCC GTCGGCCCCCGCTCCAGGCCCAACCGCTCCTTCTCGCGGGGCATCCTCTAGTCCAGCCGCTACGG L R A P L D P N A L F L A G Y S I L D A I G	6996
GTCGTGATCACCGTGTGGTCACCGGGTCCGGTGGCGCCATCGGAGTGCACGTTGAGGACGACGGC CAGCAGCTAGTGGCACACCAAGTGGCCAGGCCACCGCGGTAGCCTCACGTGCAACTCCTGCTGCCG D D I V T H D G P G T A G D S H V N L V V A	7062
CCCGGCGAAGGCCTTGCGCAGGGCGAGGGTCAGCTCCCGGATCGGGGCGGCCTCCAGGATGTGCAG GGGCCGCTTCCGGAACGCGTCCCGCTCCAGTCGAGGGCCTAGCCCCGCCGAGGTCTACACGTC G A F A K R L A L T L E R I P A A E L I H L	7128
GTAGGCGATGCCGAGCGGCTCGATCGCCTGCACCAGCGCGGTGTACGTGGCCTCCGGAGCGGGCTC CATCCGCTACGGCTCGCCGAGCTAGCGGACGTGGTTCGCGCCACATGCACCGGAGGCCTCGCCCGAG Y A I G L P E I A Q V L A T Y T A E P A P E	7194
GTCGATGTCGTTGTACGGGTTGCCGGGCGAGATGCGCAGTGCGGTGCGCTCCGGGCCGATCTCGGC CAGCTACAGCAACATGCCCAACGGCCCGCTCTACGCGTCACGCCACGCGAGGCCCGGCTAGAGCCG D I D N Y P N G P S I R L A T R E P G I E A	7260

GGCGACGGCCTTGACGACCTCGACGGCGAACGGGATGCGGGCCTCGTCGGAGCCGCCCCACGCGTC CCGCTGCCGGAAGTGTCTGGAGCTGCCGCTTGCCCTACGCCCCGAGCAGCCTCGGCGGGGTGCGCAG A V A K V V E V A F P I R A E D S G G W A D	7326
GGTGCGCCGGTTGGTGTGGGGGCCAGGAACTGCTGGATGAGATAGCCGTTGGCGCCGTGACGCTC CCACGCGGCCAACCAACCCCCGGTCCTTGACGACCTACTCTATCGGCAACCGCGGCACGTGAG T R R N T N P A L F Q Q I L Y G N A G H L E	7392
GACCCCGTCGAATCCGGCTTCCACGGCGTTGCGGGAGGCGGTGACGAAGTCGGCGACGGTCGCGTG CTGGGGCAGCTTAGGCCGAAGGTGCCGCAACGCCCTCCGCCACTGCTTCAGCCGCTGCCAGCGCAC V G D F G A E V A N R S A T V F D A V T A H	7458
GATCTCGGCGTCCGTCAGCTCGCGCGGCTCGACGAAGTCCTTCGGCCCCGACGTGGGTGTAGACCTG CTAGAGCCGCGAGGCAGTCGAGCGCGCCGAGCTGCTTCAGGAAGCCGGGCTGCACCCACATCTGGAC I E A D T L E R P E V F D K P G V H T Y V Q	7524
TCCCTCGGCCTTGACCGGGGAGGCGCTGACGGGGACGAGGCCGTCCGGCATGGAGGACCGGGTGGC AGGGAGCCGGAAGTGGCCCCCTCCGCGACTGCCCCGTCTCCGGCAGGCCGTACCTCCTGGCCCCACCG G E A K V P S A S V P V L G D P M S S R T A	7590
CGATGCGGCCCTGGCGTGCATGATCTGGGCGAAGATCCGGCCGCCCTCGGCGTGCACCGCGTCGGT GCTACGCCGGGACCGCACGTACTAGACCCGCTTCTAGGCCGGCGGGAGCCGCACGTGGCGCAGCCA S A A R A H M I Q A F I R G G E A H V A D T	7656
GACCTTGCGCCAGGAAGCGACCTGTTTCGGCGCTGCGCAGACCCGGCGTGGTGGGGTAGCCCTGGCC CTGGAACGCGGTCTTCGCTGGACAAGCCGCGACGCGTCTGGGCCGACCAACCCCATCGGGACCGG V K R W S A V Q E A S R L G P T T P Y G Q G	7722
CACGACGGACGGCTGGATGCCTTCGGTGATCACGAGGCCGGCCGAGGCGCGCTGGGCGTAGTACGT GTGCTGCCTGCCGACCTACGGAAGCCACTAGTGCTCCGGCCGGCTCCGCGCGACCCGCATCATGCA V V S P Q I G E T I V L G A S A R Q A Y Y T	7788
GGCGGTGAGCTCGGTGGCGGTGCCGCCCTCACCGGCCCGGCTGCGGGTCATCGGGGCCAGCGCGAT CCGCCACTCGAGCCACCGCCACGGCGGGAGTGGCCGGGCCGACGCCAGTAGCCCCGGTCGCGCTA A T L E T A T G G E G A R S R T M P A L A I	7854
GCGGTTGGCCAGCTGGGCTCCGGACAGGTGCATCGGGTCGAAAGCGGTGGTCATGAGGGCTCCCTT CGCCAACCGGTGACCCGAGGCCTGTCCAGCTAGCCAGCTTTCGCCACCAGTACTCCCAGGGGA R N A L Q A G S L D I P D F A T T M <- <i>orfD</i>	7920
GTTTGTATGTGGTCGGCCAAGCATCGGCGACAGCGGCAACTGTAACCCATTGATTGGTCGACCGAC CAAACATACACCAGCCGGTTCGTAGCCGCTGTGCGCGTTGACATTGGGTAACTAACCAGCTGGCTG	7986
CAAGGTAAAGTTGCGGAAACCGTCGGGCATCATCGAAAGCCGCCGCTGCACCCCCGAGGACCCCA GTTCCATTTCAACGCCTTTGGCT.....	8052
GGAGCCCGCCATGACCACCGCCGCGCCACCCCGCGGAAGACGCCTGTATCGAACGCGCTGCCCA	8118
TGGCGGCGCTCAGCGGGCCCGTCAAGCCACGCCGTGTCCCGGGTGGCCCGGCTGCACCGGACGGCG	8184
GCGGGCAAGGCGCTCAAGGGAGTGGACCTCTACCCGGGGCAGGAGTTGCTGATGATGCACCTGTGG	8250
GACCGGGGCGCGGTCCGTCAGACGGAGCTGATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAG	8316
TCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAACAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTTCGGACAGTGCTCC	8382
GAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTACTGGC	8448
GATGCTGTGCGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCC	8514

TACAGCATCCTTGCGGTGACGGTGCCGAGCGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATACACGG	8580
TGCCTGACGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGT	8646
CAAACATGAGAATTC	8661

**Abb. 16: Nukleotidsequenz und übersetzte Aminosäuresequenzen der identifizierten ORFs des 8,7 kb *Bam*HI/*Eco*RI-Fragments von *cosAF1*.** Shine-Dalgarno-Sequenzen sind umrandet. „Inverted repeats“ sind durch entgegengesetzt orientierte gestrichelte Pfeile dargestellt. Dabei wurde nur der nichtkodierende Bereich untersucht. Für das Stopkodon eines ORFs steht ein \*. fM: N-Formylmethionin. Die Orientierung der ORFs ist durch einen Pfeil angegeben. Die Konsensussequenz für einen hypothetischen  $\sigma_B$ -abhängigen Promotor ist unterstrichen (consensus GTTTAA-N<sub>12-14</sub>-GGGTAT). Der Promotor-Bereich vor dem *orfD* ist gepunktet unterstrichen. Dieser zeigt Ähnlichkeit zu dem *proP*-Promotor aus *E. coli* (consensus TTGATC-N<sub>17</sub>-TAGGGT).

Der intercistronische Bereich von *orfB* und *thpA* von 310 Basen enthält einen möglichen Promotor, der Sequenzähnlichkeiten mit  $\sigma^B$  aus *Bacillus subtilis* aufweist. Der  $\sigma^B$  aus *Bacillus subtilis* ist für die Transkription von allgemeinen Stressproteinen, die z.B. durch Salz induziert werden, verantwortlich [Hecker et al., 1996]. Darüber hinaus wurde nur noch eine mögliche Promotorsequenz vor dem *orfD* gefunden. Diese Sequenz zeigt eine Ähnlichkeit zu der Promotorsequenz von *proP* aus *E. coli* [Mellies et al., 1995]. *ProP* kodiert für einen Osmolyten-Transporter und ist osmosensitiv. Die entsprechenden Konsensussequenzen sind in der Legende zu Abb. 16 gezeigt.

Die Auswertung der Nukleotidsequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen erfolgt für jeden identifizierten ORF einzeln in den nachfolgenden Kapiteln.

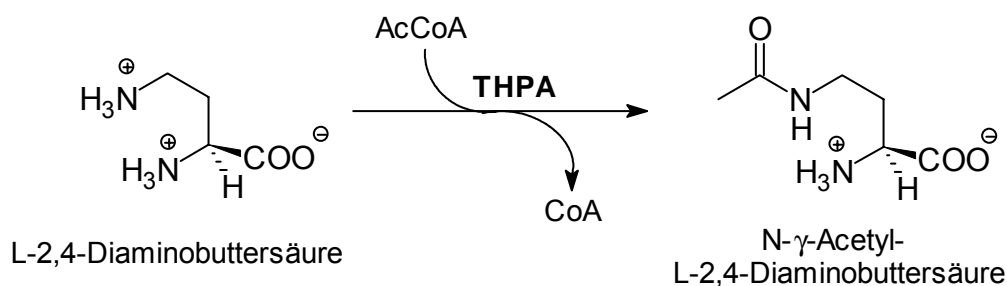
### 5.3.1. Analyse von *thpA*

Wie aus Abb. 12 und 14 ersichtlich ist, hybridisiert das Oligonukleotid 170498A mit dem Bereich, der den als *thpA* bezeichneten ORF trägt. Es war deshalb zu vermuten, daß dieser ORF die DABA-Acetyltransferase kodiert. Der 531 bp große offene Leserahmen von Position 2385 bis 2915 in Abb. 16 kodiert für ein 177 Aminosäuren langes Protein mit einer Molmasse von 19,3 kDa und einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 4,5. Der G+C-Gehalt des ORFs beträgt 68,5% und steigt in der dritten Kodonposition auf 87,6%.

Die Peptidsequenzen, die durch die Sequenzierung des N-Terminus und von internen Peptidsequenzen der möglichen DABA-Acetyltransferase erhalten

wurden, konnten alle in der abgeleiteten Aminosäuresequenz wiedergefunden werden (Abb. 18).

Durch Datenbankrecherchen wurden Ähnlichkeiten zu verschiedenen Acetyltransferasen gefunden. Die höchste Homologie wurde zu der während dieses Projekts publizierten L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (ECTA) aus *Marinococcus halophilus* gefunden (Identität: 42%) [Louis und Galinski, 1997]. Diese Acetyltransferase ist Bestandteil des Ectoin-Biosynthescluster aus *M. halophilus* [Louis und Galinski, 1997]. Dies bewies weiter, daß *thpA* mit großer Wahrscheinlichkeit für die DABA-Acetyltransferase kodiert, welche die in Abb. 17 gezeigte Reaktion katalysieren könnte.



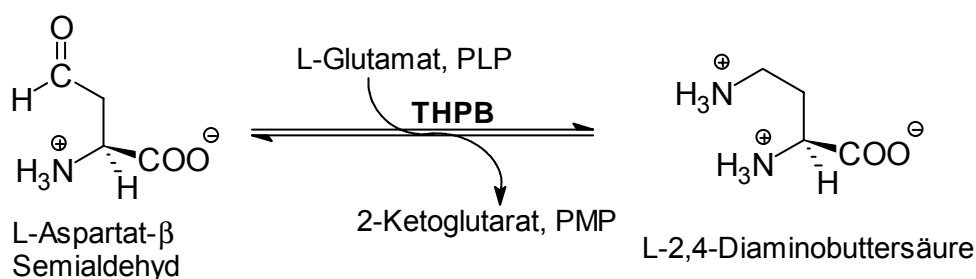
**Abb. 17: Acetylierung von DABA.** THPA: mögliche DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus*

	Kel14NT		Kel16P4	
THPA_S.chry:	MTAA-----P-ADFAR-----ARSEFLSIDAPRVEDGAALWRIARDSQVLD	:	40	
ECTA_M.halo:	METK-----MTGTN-----GSVDSIVFDKPTVEDGADMWELVKNS-TLD	:	38	
ECTA_H.elon:	MNATTEPFTESADLAKPSVADAVVGHEASPLFTRKPSPDGWDGTYELVKSCPPLD	:	55	
	Kel17P2			
THPA_S.chry:	LNSSYSYLLWCRDFAATSAAVARGENGEPFAFVTGYVRDREQTLVVWQVAVDQAH	:	95	
ECTA_M.halo:	LNSSKYITMMCEFFAETCVVAK-ENDELVGFVTAFFPPEKQDITVFWVQVGVDTSQ	:	92	
ECTA_H.elon:	VNSAYAYLLLATQFRDSCAVATNEEGEIVGFVSGYVKSNAEDTYFLWQVAVGEKA	:	110	
THPA_S.chry:	RGKGLAALLDALTARVAADQVLSSVETTITPDNTASDRLETSYAQRHDVALEKE	:	150	
ECTA_M.halo:	RGKGLASRLNALLERDVCENVL-YLEATITPSNEASQALEKKLAQKRETEVTVS	:	146	
ECTA_H.elon:	RGTLARRLVEAVMTRPEMAEVH-HLETTITPDNQASWGLFRRLADRWQAPLNSR	:	164	
	Kel15P6			
THPA_S.chry:	VLFDGELFFEEETHLPEVLYRIGPFAT---	:	176	
ECTA_M.halo:	ECFTEDLFPDDEHEEELTFRIGPFTK---	:	172	
ECTA_H.elon:	EYFSTDQLGGE-HDEENLVRIGPFQTDQI	:	192	

**Abb. 18: Vergleich der Aminosäuresequenzen von THPA aus *S. chrysomallus* und anderen Acetyltransferasen.** ECTA\_M.halo (L-2,4-Diaminobuttersäure Acetyltransferase) aus *Marinococcus halophilus* und ECTA\_H.elon (L-2,4-Diaminobuttersäure Acetyltransferase) aus *Halomonas elongata*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt. Die durch N-terminale Sequenzierung erhaltenen Peptidsequenzen der DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus* sind durch |=| gekennzeichnet.

### 5.3.2. Analyse von *thpB*

Im Abstand von 159 Basen hinter dem Stopkodon des Gens *thpA* beginnt ein 1263 Basen langer ORF, als *thpB* bezeichnet, der sich von Position 3074 bis 4336 erstreckt (Abb. 16). Er kodiert für ein mögliches Protein mit einem Molekulargewicht von 45,9 kDa. Der errechnete pI-Wert beträgt 4,8. Der durchschnittliche G+C-Gehalt beträgt 69,6% und in der dritten Kodonposition 97,2%. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zu Transaminasen (Abb. 20). Die höchste Homologie wurde zu der L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase (ECTB) aus *Halomonas elongata* gefunden (Identität: 53%) [Cánovas *et al.*, 1998], die ein von *ectB* kodiertes Protein aus dem Ectoin-Biosynthesecluster aus *H. elongata* ist. Bei dieser Transaminase handelt es sich wahrscheinlich um einen Vertreter der  $\omega$ -Aminosäure-Transaminasen, die der Untergruppe II der Transaminasen zugerechnet werden [Metha *et al.*, 1993]. Bei dem abgeleiteten *thpB* Genprodukt handelt es sich daher wahrscheinlich um die L-2,4-Diamino-buttersäure-Transaminase aus *S. chrysomallus*, welche die in Abb. 19 gezeigte Reaktion katalysieren könnte.



**Abb. 19: Bildung von L-2,4-Diaminobuttersäure (DABA) aus L-Aspartat- $\beta$ -Semialdehyd.**

THPB: mögliche DABA-Transaminase aus *Streptomyces chrysomallus*;  
 PLP: Pyridoxal-5-phosphat; PMP: Pyridoxaminphosphat

```

THPB_S.chry: VTITPPALSVFETLESEVRSYCR-GW-----PAVFDRAQGARLTDEDGHSYLDFFAGAGSLNYGHNNPVLKRALIDYIERDGI THGLDMAT : 85
ECTB_H.elon: ----MQTQILERMESDVRTYSR-SF-----PVVFTKARNARLTDEEGREYIDFLAGACTLNYGHNNPHLKQALLDYIDS DGI VHG LDFWT : 80
ECTB_M.halo: --MMQNDLSVFNEYESEVRSYVR-GF-----PTVEHQAKGYKLWDLDCKEYVDFFSGAGALNYGHNDENMKQKILTYIQEDGVTHSLDMAT : 83
PATR_S.coel: -MTPQPSPQAGAAVKAADRAHVFHWSAQELIDPLAVAGAEGSYFWDYECKRYLDFSSGLVYTNITCYQHP----KVVAATQEQAARMTTFAPA : 88

THPB_S.chry: TAKRAFLETQNVILRPRDLPYKVMFPGPTGTNAVESALKLARKVKGRESVVSFTNAFHGMSLGS LAVTGN-AFKRAGAGIPLVHGTPMPFDN :177
ECTB_H.elon: AAKRDYLETLEEVILKPRGLDYKVHLPGPTGTNAVEAAIRLARVAKGRHNIVSFTNGFHCVTMGALATTGNRKFRATGGVPTQAASFMPFDG :173
ECTB_M.halo: KAKGEFIDAFQNIILKPRNMDYKIMFPGPTGANSVESALKLARKVTGRTNVVSFTNGFHCMTIGALSVTGN-KEKRNGAGMPLSNTSTLPYDQ :175
PATR_S.coel: FAVEARSEAARLIAERTPGDLDKIFFETN-GGADAVEHALRMARLHTGRPKVLSAYRSYHGCTQQAVNVTCGPRRWASDSGTAGVVHFWAPFLY :180

THPB_S.chry: ---YFDGTVPDFLWFERLLEDQSGLNKP---AAVIVETVQEGGINVARAEWLRLALQELCLRQVMLLIVDDIQMCCGRTGCGFFSFEEAGIVP :264
ECTB_H.elon: ---YLGSSDTLDYFEKLLGDKSGGLDVP---AAVIVETVQEGGINVAGLEWLKRLESTCRANDILLIIDDIOAGCGRTGKFFSFEEHAGITP :260
ECTB_M.halo: ---FLKESNNSIEYIENFLDNGGSGLDKP---AAVIVETVQEGGLNAASEWLRSIEKTCRERDILKLLDDVQAGVGRGTGTFSSFEPA GIKP :262
PATR_S.coel: RSRFYAETEEQECARALEHMETTIAFEGPGTIAAIVLETIPGTAGIMMPPAGYLAGVREICDKYGLVFLDEVMAFGRTGTWFAADLYDVVP :273

THPB_S.chry: DIVTLSKSLISGYGLPMSLCLFKPELDI-WEPGEHNG--TFRGNPFAFVTAAAVLDAYWADGQMEKQTLARGEQVEQTLAICAEEP TAQ---- :350
ECTB_H.elon: DIVTNSKSLSGYGLPFAHVLMPPELDK-WKPGQYNG--TFRGFNLAFATAAAAMRKYWSDDTFERDVQRKARIVEERFGKIAAWLSENGIEAS :350
ECTB_M.halo: DFCVLSKSLIGNGSPLAITLVAPYDK-FAPGEHNG--TFRGNMFAFVTGTEALN-YWKDDRLEKNVQEKSERITSFIDDMIKKHPEMKGV-- :349
PATR_S.coel: DLMTFAGKGVNSGYVPLGGVAISAEIAATFAERPYPGGLTYSCHPLACAAAVATINVMAEEGVVEHAARLGAEVVEPALRELAERHPSVG---E :363

THPB_S.chry: FRGRGLVWGMFEFE-----DKARASAVCARAFELGILLLETSGPQS-----EVVKLLPPLTITPEELDEGLRTLARC VRETA----- :420
ECTB_H.elon: ERGRGLMRGIDVG-----SGDIADKITHQAFENGLI IETSGQDG-----EVVKCLCPLTIPDEDLVEGLDILETSTKQAFS----- :421
ECTB_M.halo: RKGRGFMQGIMSP-----IEDLADNIAGRCFEHGLIMETAGAED-----EVFKLFPPTITDDEGLERGLSILQQAIEEVTAESNLVAK :427
PATR_S.coel: VRGTGMFWALELVRNRETREPLVPYNATGQAATPMSAFAASAKAHGLWPFVNMNRTHVVP CNVSEABLKEGLAALDTALSVAD EYTE---- :451

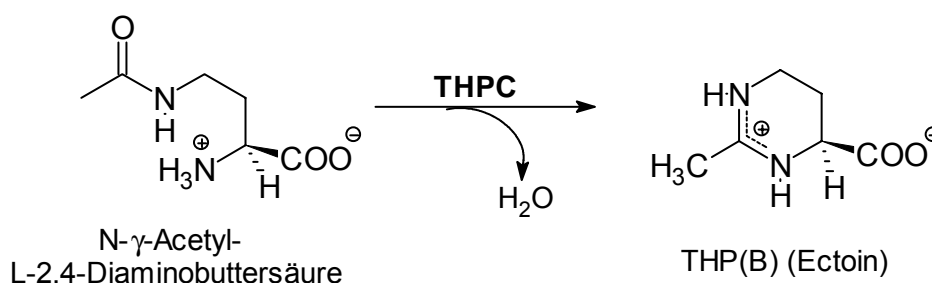
```

**Abb. 20: Vergleich der Aminosäuresequenzen von THPB aus *Streptomyces chrysomallus* und anderen Transaminasen.**

THPB\_S.chry (putative L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase) aus *Streptomyces chrysomallus*, ECTB\_H.elon (L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase) aus *Halomonas elongata*, ECTB\_M.halo (L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase) aus *Marinococcus halophilus* und PATR\_S.coel (putative Aminotransferase) aus *Streptomyces coelicolor*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt.

### 5.3.3. Analyse von *thpC*

Der 399 Basen lange ORF *thpC* beginnt 87 Basen nach dem Stopkodon von ORF *thpB* (Position 4423 bis 4821, Abb. 16). Er kodiert für ein mögliches Protein mit einem Molekulargewicht von 14,9 kDa und einem rechnerischen pI von 4,7. Der durchschnittliche G+C-Gehalt beträgt 64,7% und in der dritten Kodonposition 91,7%. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zur Ectoin-Synthase (AcDABA-Cyclase) aus *Marinococcus halophilus* (Identität: 39%) [Louis und Galinski, 1997]. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird daher *thpC* für die AcDABA-Cyclase aus *S. chrysomallus* kodieren, welche die in Abb. 21 gezeigte Reaktion katalysieren könnte.



**Abb. 21: Cyclisierung von N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure.**

THPC: mögliche AcDABA-Cyclase aus *Streptomyces chrysomallus*

```
THPC_S.chry: VIVRSFSDIENTDRHVKAASGTWESKRIVLAKEKVGFSLHETVLYAGTET : 50
ECTC_M.halo: MKVIKLEDLLGTER--EVDGDNWVSRRFIMKDDNMGYSVNDTIIRAGTET : 48
ECTC_H.elon: MIVRNLEECRKTERFVEAENGNDSTRLVLADDNVGFSFNITRIHPGTET : 50
```

```
THPC_S.chry: SMWYANHIEAVLCTEGEAEILTNDGTETHWITPGTMYLLDGHHERHTMRPK : 100
ECTC_M.halo: HIWYQNHLETVYCTEGDGEIETLSDNKVYQLEPGVLYALDKNDEHMLRGG : 98
ECTC_H.elon: HIHYKHHFEAVFCYEGEGEVETLADGKIHPKACDMYLLDQHDEHLLRGK : 100
```

```
THPC_S.chry: T-DFRCVCFVFNPPVTGREDDHENGVPYLLTEEA : 132
ECTC_M.halo: SKDMRMVCFVFNPPVLSGREVHDENGVPADLD-- : 129
ECTC_H.elon: EKGMTVACVFNPALTGREVHREDGSY-APVD-- : 130
```

**Abb. 22: Vergleich der Aminosäuresequenzen von THPC aus *S. chrysomallus* und anderen Ectoin-Synthasen.** THPC\_S.chry (mögliche AcDABA-Synthase) aus *Streptomyces chrysomallus*, ECTC\_M.halo (Ectoin-Synthase) aus *Marinococcus halophilus* und ECTC\_H.elon (Ectoin-Synthase) aus *Halomonas elongata*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt.

### 5.3.4. Analyse von *thpD*

Der im Anschluß nach *thpC* beginnende ORF ist 894 Basen lang und erstreckt sich von Position 4828 bis 5721 (Abb. 16). Dieser ORF kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 32,7 kDa, das einen rechnerischen pI-Wert von 5,4 besitzt. Der durchschnittliche G+C-Gehalt beträgt 68,0% und in der dritten Kodonposition 95,6%. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Homologie zu einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium sp.* (Identität: 30%) (Abb.24) [Shibasaki *et al.*, 1995]. Dieses Enzym gehört zu der Klasse der  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen. Da bisher der Mechanismus der Hydroxylierung von THP(B) nicht geklärt ist, könnte dieses Protein, kodiert durch *thpD*, möglicherweise die Bildung von THP(A) aus THP(B) katalysieren (Abb. 23).

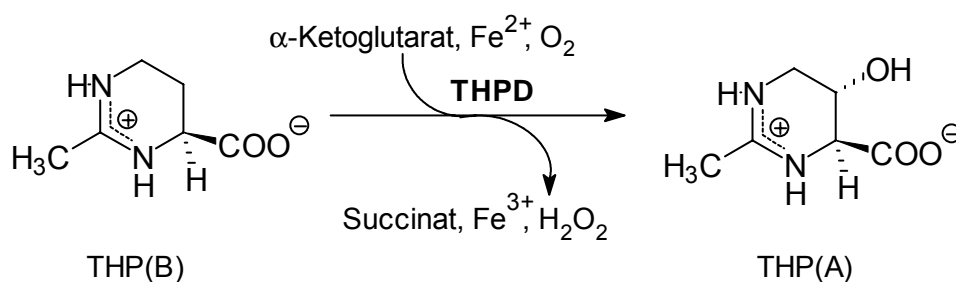


Abb. 23: Möglicher Mechanismus der durch THPD katalysierten Hydroxylierung von THP(B).



```

THPD_S.chry: MTTEVRADLYPSRGAAEMITTPRQDPVIWSAPGAPGPVAAKDLQGYEHDGF : 50
PRHY_Dacty.: -----MLTP-----TELKQYREAGY : 15
HTXA_P.stut: -----MFAE-----QQREYLDKGY : 14

THPD_S.chry: LTVDQLIAPDEVAVYQAELNRLISDPAVRADERSIVEKQSQN-----VR : 94
PRHY_Dacty.: LLIEDGLGPREVDCLRRAAAALYAQD---SPDR-TLEKDGRT-----VR : 55
HTXA_P.stut: TKIESFFSAEEVAKILEDVKQIELGAIGVASDNETYQFEKKNGETTKLLR : 64

THPD_S.chry: SVFEVHRISEVFAGLVRDERVVGRRARQILGSDVYVHQSRINVK-PGFGAT : 143
PRHY_Dacty.: AVHGCHRRDPVCRDLVRHPRLLGPAMQILSGDVYVHQFKINAKAPMTGDV : 105
HTXA_P.stut: RVENPHLYFDAIDS LVRSEKIVDLLRHFLGENIRLEHNSKINFK-PPSGAP : 113

THPD_S.chry: GFYWHSDFETWHAEDGLPNMRTVSVSTALTENFDTNCGGLMIMPGSHKT-F : 192
PRHY_Dacty.: -WPWHQDYIFWAREDGMDRPHVVNVAVLLDEATHLNGPLLFVPGTHELGL : 154
HTXA_P.stut: -VQWHQDWAFYP----HTNDDFLTGLIFLDETSEKNGAMACLPGSHKG-K : 157

THPD_S.chry: LGCAGETPK-DNYKKS L-QMQ-DAGTPSD-EALTKMADRHGIRLFTGRAG : 238
PRHY_Dacty.: IDVERRAPAGDGAQWLPLQLSADLDYAIDADLLARLTAGRGIESATGPAG : 204
HTXA_P.stut: VYDHRNVET----GEFCHAI S---RSNWD-EALDPTEG----ELLTGPVG : 195

THPD_S.chry: SATWFDCNAMHGSGDNITPYARSNVFIVFNSVEN-----AAQEPFA : 279
PRHY_Dacty.: SILLFDSRIVHGSGTNMSPHPRGVVLVTYNRTDN-----ALPAQ-A : 244
HTXA_P.stut: TVTLHHVRTLHGSGPNHSTIRRRFL LIGYAAADAWPLLGCNGYGDYESLM : 245

THPD_S.chry: APIR---RPEFIGARDFTPVK----- : 297
PRHY_Dacty.: AP-----RPEFLAARDATPLVP-----LPAGFALAQPV- : 272
HTXA_P.stut: VSGRSTVFPRMVELPLTVPYPLSMYGDRIFESQRALTQKYY : 286

```

**Abb. 24: Vergleich der Aminosäuresequenz von THPD aus *S. chrysomallus* mit anderen Hydroxylasen.**

THPD\_S.chry (mögliche Hydroxylase) aus *Streptomyces chrysomallus*, PRHY\_Dacty L-Prolin-4-Hydroxylase) aus *Dactylosporangium* sp., HTXA\_P.stut (hypothetische  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängige Hypophosphit Dioxygenase) aus *Pseudomonas stutzeri*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt.



ORFB\_S.chry: VDVPAARPEGGNVSPAPAHGPANDPEESPTVTHPFLDLPLLTADHFAAIERRVARLLATEQDVVITQCEALLPLEGCIRGGARPCESTALNVVT : 93  
 AMTR\_M.jann: MKIDAVKKLLMIPGPTMVPPEVLNAMALPVIGHRTKDYSNLLLEDTIEKLK---KVFITENDTFLITGSGTAAMDMAISNIIKRGDKVLNIVT : 89  
 AMTR\_M.ther: MEMDET--LIMIPGPTRVAQRVLKAMSENIVNHRSALEFGRILTETTEMMS----DVERTSNKSYLLTGSGTAAMTAAVANIIEPGDKILNVVG : 87  
 ASPC\_A.fulg: -----MLLMIPGPVQLHERIIRAMARQMIGHRTADFSAIMFECVEKLR---EIFGTKGDICLISGSGTAGMEAAIASFS-RVKKIATLEN : 81  
 AMTR\_S.coel: -----MNLIRISGPTPLPPRVRAALSTDMISHRSTAFRDIVAENVLAGLT----PVEGDPATILPFTCSGTGGLEAAVVNVTVRPCQORVVVSI : 82

ORFB\_S.chry: GPYGQTFGNWLRDCGAENVDLTPFHAAVTADQVAEALAAHPGIDFVSLVHAEAAATGNTNPVAEIGEVVRAH-GALFMLDAVASVCAEPLLPD : 185  
 AMTR\_M.jann: GNFGERFANIVKAYKGEAIRLDVEWGDMAEPEAVKEILDKYDDIKAVTVVHNETSTGARNPIKEIGEVVKDY-DALYIVDTVSSLGDDYVND : 181  
 AMTR\_M.ther: GKFGQORFAQIVEAFGGESITIDVEWGVKAVNPDDIGYTLLEENDDIKAVTVVHNETSTGVANPIREIGKIMDDY-DALYIVDTVSSLGDEVDVE : 179  
 ASPC\_A.fulg: GKFGERLGDIAERYT-QVERVKVPWGESFELDAVKEALDN--GCEAVAFVHNETSTGILNPAKEIAKLAKKEY-DALVIMDAITSAGDYVKMD : 170  
 AMTR\_S.coel: GYFGTRMAELIARMAGLDIEVIEVPWQGAADPGELQAVLRRLRDVAAVLVTHNETSTGVNLPLPELCRVVRESSDALLIVDVVSVGATPVMRM : 175

ORFB\_S.chry: AWGVDLGVIGAQKAMGGPAGVSAVSVSARAWERIAANPAAPRRSYLSLIDWKERWIDGGRTALPHAPAQLEMLGLEACVARTEDEGLDVTVTAR : 278  
 AMTR\_M.jann: KFHIDICVTGSQKCLAAPPGLAAITVSEKAWEVIKKN--DDKVGIFYLDLLAYKKYYE-EKKQTPYTPSVNLTYALNVALLDLVLEEGIENRVKR : 271  
 AMTR\_M.ther: SYGIDICVTGSQKCLAAPPGLAAITLSNDARVIEAV--DNPRTYLNLKKYRKSGDAEPPETPYTPAVSLIYAMHEALKVIMEEGLSNRIKR : 270  
 ASPC\_A.fulg: EWGVDAIVGSQKCLGAPPGLAAVAVSEKAWDYNN----ERCPYYLDLAAYRKKLK--DMQTPYTPAVPLFFALAEALKIIDEEGLENRIQR : 256  
 AMTR\_S.coel: DWGIDVAVGVSKALMSPPGLALLGVSSRALTAAN--PARRYFDFMTAMARAVE--ENTTYTPAIPVFHALQTALRMISVEGWDRVLAR : 263

ORFB\_S.chry: HASAAAATRAGAVALGGGLEPYVHEARDAAPVATTLRAPAGTDAAALVAAALAADPALPLVAGGALSKEMIRVNHYGADATRGAVLSSLAAL : 371  
 AMTR\_M.jann: HERLAKATRAGLEAMGIELFA---KERARSVTVTSAKYPEGIEDSKFR-GILSNKYNIVVAGGQKHLAGKIFRIGHMGCIGEK-EVLATLACV : 359  
 AMTR\_M.ther: HKIAAEATRNAVKALELFP--DEAVSSTTVTAVNLPEGVTDGELR-GTMRNKYHVELAGGQDHLKGRIFRIGHMGNITHR-ELITTFSAAL : 358  
 ASPC\_A.fulg: HRILSAAVRKWAVEAGLELFPNLNKYSSYSNTVTAIKMPEGVSDSELR-GTLKKEYGILVSGGQGEHLKGIKIFRIGTMGNVGKF-ETVSTLAAL : 347  
 AMTR\_S.coel: HQRLSEQCRSGLADLGLAFAA---DQPYASPTVTSFFVBPADMRASDVR-ERMAVEHKVQVASCRAKWKDSVLRIGHMGYVNNEN-DVAHVLAAL : 351

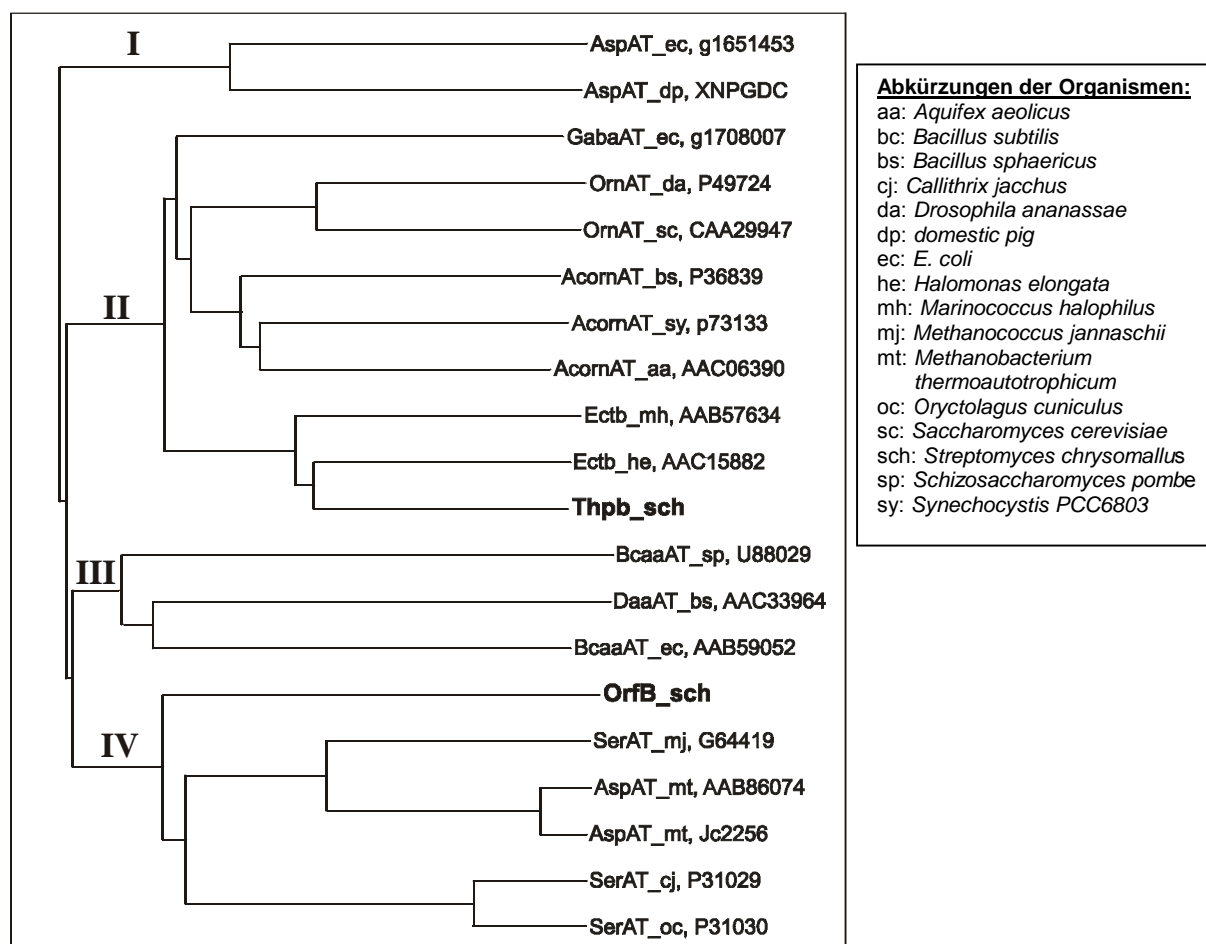
ORFB\_S.chry: GAVLTDAGRRVDIEAARRAVSETWPSL-- : 398  
 AMTR\_M.jann: ELALKELGFEVKE-SGVEVAKEVLLKE-- : 385  
 AMTR\_M.ther: EMTLRELGFVEVMEGEAAVADTYLPEDL : 387  
 ASPC\_A.fulg: EDVLMRK-NAIKP--ALQYAQILLRDLQ : 372  
 AMTR\_S.coel: GAVLDRAGGSS----- : 362

**Abb. 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen von ORFB aus *Streptomyces chrysomallus* und anderen Transaminasen.**

AMTR\_M.jann (Serin-Aminotransferase) aus *Methanococcus jannaschii*, AMTR\_M.ther (Aspartat-Transaminase) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, ASPC\_A.fulg (Aspartat-Aminotransferase) aus *Archaeoglobus fulgidus* und AMTR\_S.coel (hypothetische Amino-transferase) aus *Streptomyces coelicolor*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt.

### 5.3.6.1. Eingruppierung von THPB und ORFB in das System der Aminosäure-Transaminasenfamilien

Die beiden identifizierten Aminosäure-Transaminasen THPA und ORFB aus *S. chrysomallus* weisen untereinander nur eine geringe Identität auf. Bei der Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums von THPB, ORFB und anderen Vertretern der Aminosäure-Transaminasen ist zu erkennen, daß ORFB in die Untergruppe IV der Transaminasen eingeordnet werden kann [Mehta *et al.*, 1993]. Auffällig ist auch, daß Aspartat-Transaminasen aus der Gruppe der Archaea ebenfalls in diese Untergruppe eingeordnet werden können, im Gegensatz zu den Aspartat-Transaminasen aus anderen Organismen, die in die Untergruppe I eingeordnet werden (Abb. 27).



**Abb. 27: Phylogenetischer Stammbaum der Mitglieder der Aminosäure-Transaminasen einschließlich der THPB und ORFB Proteine aus *S. chrysomallus*.** Abkürzungen: GabaAT:  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Aminotransferase, AcornAT: Acetyl-Ornithin-Aminotransferase, OrnAT: Ornithin-Aminotransferase, AspAT: Aspartat-Aminotransferase, SerAT: Serin-Aminotransferase, Ectb: L-2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase, DaaAT: D-Alanin Aminotransferase, BcaaAT: Branched-chain-amino-acid Aminotransferase. Die verschiedenen Untergruppen der Transaminasen sind mit I-IV bezeichnet.

### 5.3.7. Analyse von *orfC*

Der *orfC*, der 101 Basen nach dem *thpD* beginnt hat eine Länge von 1038 Basen und erstreckt sich von Position 5822 bis 6859 (Abb. 16). *OrfC* grenzt unmittelbar an *orfD*, hat aber eine entgegengesetzte Orientierung und die beiden 3'-Enden von *orfD* und *orfC* überlappen in einem Bereich von 25 Basen. Der G+C-Gehalt beträgt 73,8% und steigt auf 92,8% in der dritten Kodonposition an. Das abgeleitete Protein ORFC besteht aus 346 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 37,5 kDa. Der rechnerische pI-Wert beträgt 4,4. Die Aminosäuresequenz weist keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen in der Datenbank auf.

### 5.3.8. Analyse von *orfD*

Der 1074 Basen große offene Leserahmen von Position 7908 bis 6835 (Abb. 15) kodiert für ein 358 Aminosäuren langes Protein mit einer Molmasse von 37,4 kDa. Der G+C-Gehalt beträgt 71,1% und steigt in der dritten Kodonposition auf 93,5% an. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteinen aus verschiedenen Datenbanken ergab eine hohe Ähnlichkeit zu NADPH bzw. NADH abhängigen Oxidoreduktasen (Abb. 28). Die höchste Ähnlichkeit wurde zu der Glycerol-Trinitrat-Reduktase aus *Agrobacterium radiobacter* (Identität: 43%), ein Protein der  $\alpha/\beta$ -„Faß“-Flavoproteingruppe, gefunden [Snape, *et al.*, 1997]. Dieses Enzym katalysiert den NADH abhängigen reduktiven Abbau von Glycerol-Trinitrat (GTN) zu Glycerol-Dinitrat.

ORFD\_S.chry: -----MTTAFDPIDLSGAQLANRIALAPMTRSRAGEGGTATELTATYYAQRASAG-LVITEGIQPSVVGQGYPTTPGLRSAEQVASW : 81  
 NERA\_A.radi: -----MTSLFEPAQAGDIALANRIVMAPLTRNRS-PGAIPNNLNATYYEQRATAG-LIVITEGTPISSQQGQGYADVPGLYKREAIEGW : 80  
 NCR\_P.syri : -----MPTLFDPLTLGDLQSPNRVLMAPLTRGRATREHVPTELMIEYYTORASAG-LIITEATGITQEGLGWPYAPGIWSDAQVEAW : 81  
 MORE\_P.puti: --MPDTSFSNPGLFTPLQLGSLSLPNRVIMAPLTRSR-TPDSVPGRLLQIYYGQRASAG-LIISEATNISPTARGYVYTPGIWTDQAEAGW : 87  
 OXRE\_A.thal: MENGEAKQSVPLLTTPYKMGFRNLSHRVVLAPLTRQR-SYGNVP--HAATVYSQRTTPGGFLITEATGVSDTAQGYQDTPGIWTKEHVEAW : 87

ORFD\_S.chry: RKVTDVAVHAEGRIFAQIMHARAASATRSSMPDGLVPVSA SPVKAEGQVYTH-----VGPKDFVE--PRELTDAEIHATVADFVTASRN : 163  
 NERA\_A.radi: KKITDGVHSAGGKIVAQIWHVGRISHT-SLQPHGGQPVAPSAITAKSKTYIIN--D--DGTGAFATSEPRALTIDDIGLILEDYRSGARA : 166  
 NCR\_P.syri : KPVTQAVHEAGGRITILQLWHMGRTVHS-SFLG-GAKPVSSSATRAPGQAHTYE-----GKQDYDE--ARPLSADEIPRLLNDEYHAAKN : 161  
 MORE\_P.puti: KGVVEAVHAKGGRIALQLWHVGRVSHE-LVQPDGQQPVAPSALKAEGAECFVEFEDGTAGLHPTST--PRALETDEIPGIVEDYRQAAQR : 174  
 OXRE\_A.thal: KPIVDVAVHAKGCIFFCQIWHVGRVSNS-GFQPNGKAPISCSDKPLMPQIRSNG-----IDEALFTP--PRRLGIEEIPGIVNDFRLAARN : 169

ORFD\_S.chry: AVEAGFDGVELHGGANGYLIQQFLAPNTNRRTDWGGSD EARIPFAVEVVKAVAAEIGPERTALRISPGNPNYNDIDEPAP EATY TALVQAIE : 254  
 NERA\_A.radi: ALEAGFDGVELHAANGYLIEQFLKSSTNQRTDDYGGSIENRARELLEVVDAVAEEIGAGRTGIRLSPVTPANDIFEADPQPLYNYVVEQLG : 257  
 NCR\_P.syri : AMAAGFDGVQIHAANGYLIDQFLRDNSNVRC DAYGGSIENRIRLLVEVTRRVAETVGAECTGVRLSPNGDSQGVNDSNPEPLFSAAAKALD : 252  
 MORE\_P.puti: AKRAGFDMVEVHAANACLPNQFLATGTNRRTDQYGGSIENRAREPLEVVDAVAEVFGPERVGI RLTPFLELFGLTDDPEAMAFYLAGELD : 265  
 OXRE\_A.thal: AMEAGFDGVELHGGANGYLIDQFMKDTVNDRTDEYGGSLQNRCKEPL ETVDAVAKEIGPDRVGIRLSPFADYMESGDTNPGALGLYMAESLN : 260

ORFD\_S.chry: PLCTAYLHILEAAP---IRELT-----LALRKAF--AGAVVLNVHSDGATGPGDHTVIDDGIADLISYGALFLANPDLPARLKAGGPF : 332  
 NERA\_A.radi: KRNLAFIHVVEGATGG-PRDFKQGDKPFDYASFKAAYRNAGGKGLWTANNGYDRQSAIEAVESCKVD AVAFGKAFIANPDLVRR LKNDAPL : 347  
 NCR\_P.syri : EICIAHLELR EPGYEGTFGKADRPP---VHPVIRQAFS-----RTLILNSDYTLETAQAALATGEADAITFGRPF LANPDLPHRFAERLPL : 335  
 MORE\_P.puti: RRCLAYLHFNEPDWIG--GDITYPEG--FREQMRQRFK-----GGLIYCGNYDAGRAQARLDDNTADAVAFGRPFIANPDLPERFRLGAAL : 347  
 OXRE\_A.thal: KYGILYCHVIEARMKT-MGEVHACPH--TLMPMRKAFK-----GTFLSAGGFTREDGNEAVSKGRTDLVAYGRWFLANPDLPKRFQVDAPL : 343

ORFD\_S.chry: NTPDPSTFFGGDAK-GYTDYPALDSV----- : 357  
 NERA\_A.radi: NAPNQPTFYGGGAE-GYTDYPALAQ----- : 371  
 NCR\_P.syri : NKDVMETWYSQGPE-GYVDYPTADQK----- : 360  
 MORE\_P.puti: NEPDSTFYGGAEV-GYTDYPFLDN GHDR LG : 377  
 OXRE\_A.thal: NKYDRPTFYTSDPVVGYTDYPFLESTA---- : 370

**Abb. 28: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener Oxidoreduktasen.**

ORFD\_S.chry (abgeleitetes *orfD* Protein) aus *Streptomyces chrysomallus*; NERA\_A.radi (GTN-Reduktase) aus *Agrobacterium radiobacter*; NCR\_P.syri (NAD(P)H-abhängige 2-Cyclohexen-1-on Reduktase) aus *Pseudomonas syringae*; MORE\_P.puti (Morphinon Reduktase) aus *Pseudomonas putida*; OXRE\_A.thal (12-Oxophytodienoat Reduktase) aus *Arabidopsis thaliana*. Konservierte Aminosäuren sind invertiert dargestellt.

#### 5.4. Versuch zur Insertionsinaktivierung von *thpA* und *thpB*

Zum Nachweis der Beteiligung der Gene *thpA*, *thpB* und *thpC* an der THP-Biosynthese sollten die Gene durch Insertionsmutagenese inaktiviert werden. Hierzu wurde der größte Teil der Gene *thpA* und *thpB* durch eine Thiostreptonresistenzkassette ersetzt. Nach der Transformation des Insertionsplasmids pAF1sub56 in *Streptomyces chrysomallus* wurden jedoch nur wenige thiostreptonresistente Mutanten erhalten (4.8.).

Durch Hybridisierungsexperimente konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß bei den thiostreptonresistenten Mutanten ektopische Integrationen der Genfragmente stattgefunden hatten.

Generell war bei den Experimenten mit *S. chrysomallus* nur eine geringe Transformationsrate zu beobachten. Weitere Insertionsinaktivierungsversuche wurden nicht vorgenommen. Statt dessen wurden die Gene *thpA*, *thpC* und *thpD* heterolog exprimiert (5.5.) und die Genprodukte charakterisiert.

#### 5.5. Expression von *thpA*, *thpC* und *thpD* in *E. coli* bzw. *S. lividans*

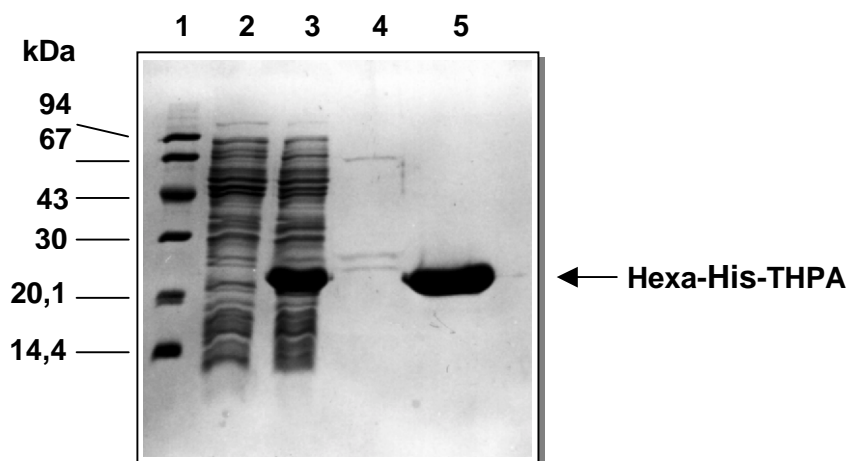
Um zu zeigen, ob die Gene *thpA*, *thpC*, *thpD* für THP-Biosyntheseenzyme kodieren, sollten diese Gene exprimiert und die rekombinanten Enzyme gereinigt und charakterisiert werden. Mit diesen Enzymen sollte ferner die *in vitro* Synthese von THP(B) bzw. THP(A) durchgeführt werden. Auf die Expression von *thpB* wurde verzichtet.

##### 5.5.1. Expression von *thpA* in *E. coli* M15 als Hexa-HIS-Fusionsprotein

Das Gen *thpA* wurde als *Bam*HI/*Hind*III-PCR-Fragment hinter den *lacZ* Promotor in den Expressionsvektor pQE30 kloniert (4.6.1.1.). Hierdurch erhält das exprimierte Fusionsprotein eine Hexa-His-Sequenz am Aminoterminal, um die spätere Reinigung des Proteins zu erleichtern.

Nach Transformation in *E. coli* M15 und Induktion mit IPTG wurde das Protein durch Affinitätschromatographie an einer Nickelchelate-Matrix gereinigt (4.9.2.). Als Kontrollansatz diente eine *E. coli* M15 Kultur mit dem pQE30 Plasmid ohne Insert. Die Affinitätschromatographie resultierte in einer Enzympräparation apparenter Homogenität. Gleichzeitig zeigte sich, daß der gesamte Teil des THPA Proteins in löslicher Form vorlag und im Bereich von 30-100 mM Imidazol

eluierte (Abb. 29). Mit einer Größe von ca. 21 kDa im SDS-Polyacrylamidgel wurde die berechnete Größe von 20,7 kDa für das Hexa-His-Fusionsprotein bestätigt.



**Abb. 29: SDS-PAGE des Hexa-His-THPA-Fusionsprotein aus *E.coli* M15.**

Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes 15%iges SDS-Polyacrylamidgel. Spur 1: Proteinmarker, Spur 2: Rohextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpA (160 µg), Spur 3: Rohextrakt aus *E. coli* M15 pQE30, Spur 4: an der Ni-Matrix gebundenes Protein, (30-100 mM Imidazol) aus *E. coli* M15 pQE30 (5 ng), Spur 5: an der Ni-Matrix gebundenes Protein, (30-100 mM Imidazol) aus *E. coli* M15 pQE30thpA (37 µg).

Die Aktivität wurde mit Hilfe des DTNB-Tests ermittelt (4.10.1.). Im Vergleich zum Wildtyp THPA-Protein aus *S. chrysomallus* wurde eine um den Faktor 1000 erhöhte spezifische Aktivität gefunden. Dabei ist zu beachten, daß das Wildtypenzym stets nur in partiell gereinigter Form vermessen werden konnte. Es zeigte sich außerdem, daß das gereinigte Hexa-His-THPA-Fusionsprotein eine hohe Stabilität aufwies. So konnte nach 6 Tagen Lagerung bei 0°C nur eine 10%ige Abnahme der DABA-Acetyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden.

**Tab. 3: Reinigung des Hexa-His-THPA-Fusionsprotein aus *E. coli* M15.**

Ein Unit entspricht der Menge an Enzym, die 1 µmol Acetyl-Coenzym A pro Sekunde in N-γ-Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure konvertiert.

Reinigungsstufe	Volumen [ml]	Protein [mg]	Units [µkat*10 <sup>3</sup> ]	Spez. Aktivität [µkat*10 <sup>3</sup> /mg]
Zellextrakt <sup>*)</sup>	18	261,5	n.b. <sup>*)</sup>	n.b. <sup>*)</sup>
Ni-NTG-Matrix	20	79,4	1733	21,8

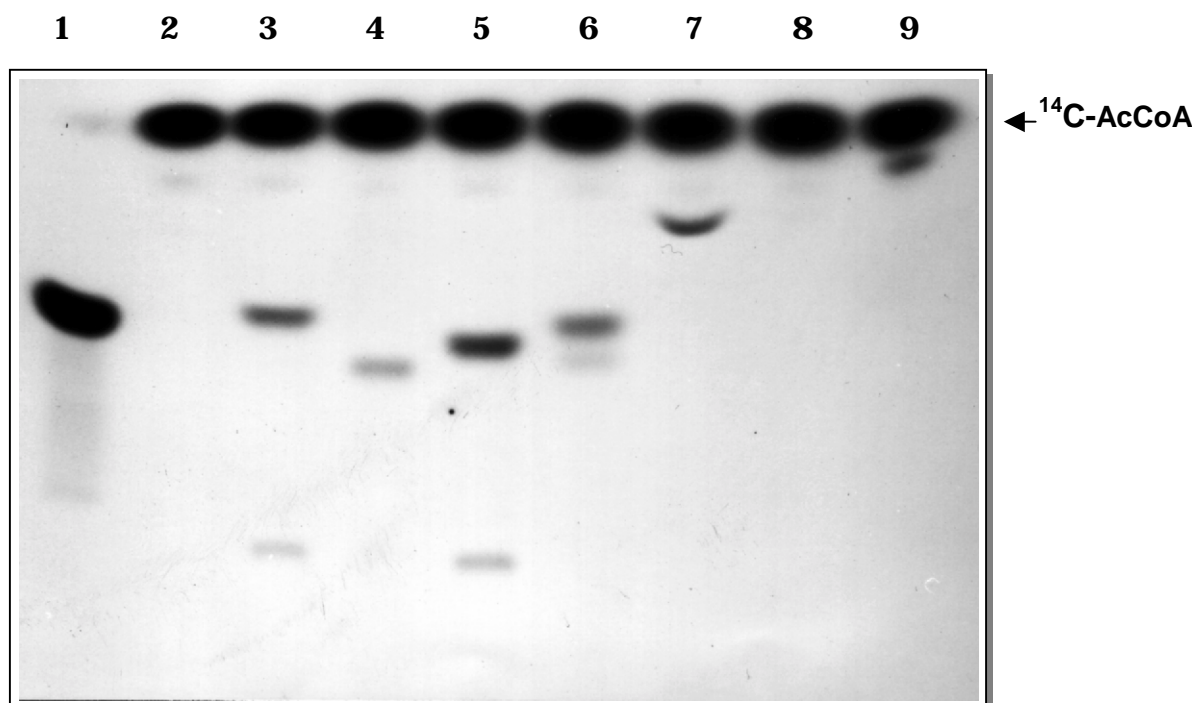
<sup>\*)</sup> 2 g Zellen wurden verwendet

<sup>\*)</sup> nicht bestimmt



### 5.5.1.1. Charakterisierung des Hexa-His-THPA-Fusionsproteins

Für die Messung der Substratspezifität wurden L-2,4 Diaminobuttersäure (DABA) sowie strukturell ähnliche Aminosäuren in Gegenwart von  $^{14}\text{C}$ -AcCoA als Cosubstrat getestet (4.10.1.). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C. Unter diesen Bedingungen wurde das eingesetzte AcCoA von DABA fast vollständig verbraucht. Im Falle von L-Lysin, L-Ornithin und L-2,3-Diaminopropionsäure wurden jeweils zwei neue Verbindungen gebildet. Bei L- $\beta$ -Lysin, L- $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und L- $\epsilon$ -Aminocapronsäure konnte die Bildung von jeweils einem Produkt nachgewiesen werden. Lediglich L- $\beta$ -Aminobuttersäure wurde nicht als Substrat akzeptiert (Abb. 30).



**Abb. 30: Enzymatische Bildung von N-Acetylaminosäuren aus DABA und Substratanaloga durch rekombinantes Hexa-His-THPA-Fusionsprotein.**

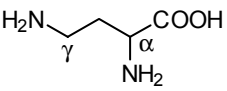
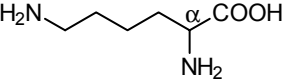
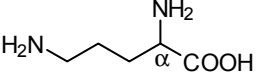
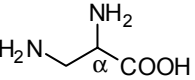
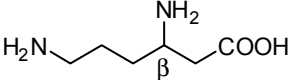
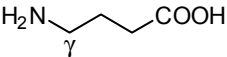
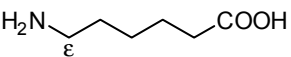
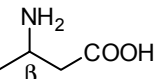
Die Reaktionsgemische wurden dünnschichtchromatographisch in Laufmittel I aufgetrennt. Das abgebildete Autoradiogramm entstand nach 7 Tagen Exposition des Röntgenfilms. Der Reaktionsansatz enthielt 25 mM Substrataminosäure, 2,5 mM AcCoA, 0,05  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -AcCoA, 15  $\mu\text{kat}$  Hexa-His-THPA-Fusionsprotein, 100 mM Tris-HCl pH 8, in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$ . Von jedem Reaktionsansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  auf die DC aufgetragen. Spur 1: DABA, Spur 2: Referenz (Wasser), Spur 3: L-Lysin, Spur 4:  $\beta$ -Lysin, Spur 5: L-Ornithin, Spur 6: 2,3-Diaminopropionsäure, Spur 7:  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Spur 8:  $\beta$ -Aminobuttersäure, Spur 9:  $\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure

Da die verschiedenen acetylierten Aminosäuren als Referenzmaterial nicht vorlagen, wurde die weitere Analyse der Produkte nicht vorgenommen. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den Produkten um die acetylierten Verbindungen handelt, da bei jedem getesteten Substrat Banden mit

unterschiedlichen  $R_f$ -Werten auftraten. Die einzelnen Substratumsetzungen wurden durch Integration der Peakflächen ermittelt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 4 gezeigten Werte.

**Tab. 4: Substratspezifität des Hexa-His-THPA-Fusionsproteins.**

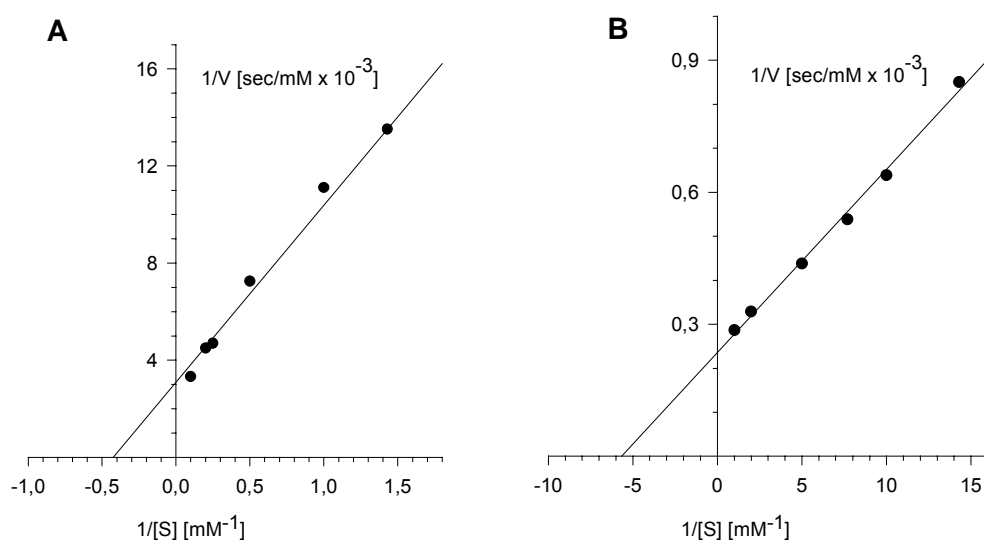
Die Substratumsetzung wurde durch Messung des eingebauten  $^{14}\text{C}$ -AcCoA bestimmt. Die Substratkonzentrationen betrugen 25 mM für die Aminosäure und 2,5 mM für AcCoA. Da keine genaue Produktanalyse vorgenommen wurde, sind für die Produkte ihre entsprechenden  $R_f$ -Werte angegeben. Die  $R_f$ -Werte beziehen sich auf das Laufmittel I.

Substrat	Produkt	Substratumsetzung [%]
DABA 	$\gamma$ -Acetyl-DABA $R_f$ : 0,61	98,2
L-Lysin 	$R_f$ : 0,24 $R_f$ : 0,60	1,8 9,6
L-Ornithin 	$R_f$ : 0,22 $R_f$ : 0,54	3,0 16,3
2,3 Diaminopropionsäure 	$R_f$ : 0,52 $R_f$ : 0,61	2,8 8,5
$\beta$ -Lysin 	$R_f$ : 0,52	5,5
$\gamma$ -Aminobuttersäure 	$R_f$ : 0,72	11,7
$\epsilon$ -Aminocapronsäure 	$R_f$ : 0,78	9,2
$\beta$ -Aminobuttersäure 	-	-
Wasser	-	-

Bei L-Lysin, L-Ornithin und L-2,3-Diaminopropionsäure handelt es sich bei den Hauptprodukten wahrscheinlich um die  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\beta$ -acetylierten Verbindungen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei einem des jeweils gebildeten Produkts um die diacetylierte Form handelt. Bei DABA, wo zwischen den beiden Aminogruppen zwei  $\text{CH}_2$ -Einheiten vorhanden sind, erfolgt die Acetylierung ausschließlich an der  $\gamma$ -Aminogruppe. Dies läßt vermuten, daß durch den unterschiedlichen Abstand der beiden Aminogruppen im L-Lysin (vier  $\text{CH}_2$ -Einheiten), L-Ornithin (drei  $\text{CH}_2$ -Einheiten) bzw. L-2,3-Diaminopropionsäure (eine  $\text{CH}_2$ -Einheit) die Spezifität erniedrigt wird. Bei L- $\beta$ -Lysin erhält man nur ein Produkt, das wahrscheinlich die  $\epsilon$ -acetylierte Verbindung ist. Liegt wie im Fall von L- $\beta$ -Aminobuttersäure nur eine Aminogruppe in  $\beta$ -Stellung vor, so wird keine Produktbildung beobachtet. Die L- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure sowie die L- $\gamma$ -Aminobuttersäure werden ebenfalls acetyliert. Dies bedeutet, daß eine Acetylierung auch unabhängig von dem Vorhandensein einer  $\alpha$ -Aminogruppe stattfindet, wenn die entsprechende Aminogruppe sich in  $\epsilon$ - oder  $\gamma$ -Position befindet.

#### 5.5.1.2. Bestimmung der $K_m$ -Werte für das Hexa-His-THPA-Fusionsprotein

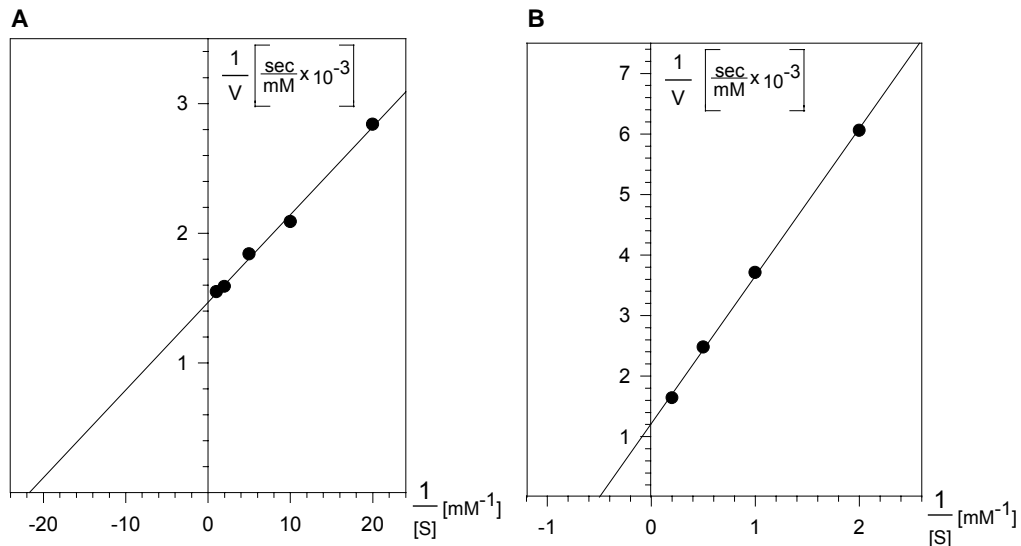
Kinetische Messungen für das Hexa-His-THPA-Fusionsprotein ergaben einen  $K_m$ -Wert von 2,3 mM für DABA und für AcCoA einen  $K_m$ -Wert von 0,18 mM (Abb. 31).



**Abb. 31: Bestimmung der  $K_m$ -Werte für das Hexa-His-THPA-Fusionsprotein**

- A: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der AcCoA Konzentration (25 mM DABA im Reaktionsansatz)  
B: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DABA Konzentration (1 mM AcCoA im Reaktionsansatz)

Zum Vergleich wurde dann das Wildtyp-Enzym (AcA54-Stufe) aus *S. chrysomallus* vermessen (Abb. 32).



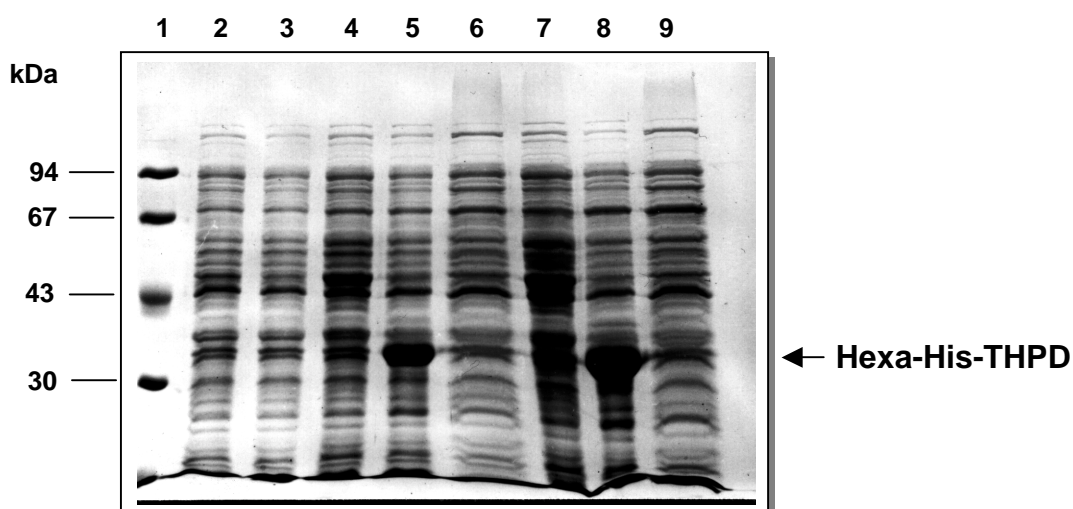
**Abb. 32: Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus*.**

- A: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der AcCoA Konzentration (25 mM DABA im Reaktionsansatz)  
 B: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DABA Konzentration (1 mM AcCoA im Reaktionsansatz)

Dabei wurde ein vergleichbarer  $K_m$ -Wert von 2 mM für DABA gefunden. Der  $K_m$ -Wert für AcCoA mit 0,05 mM liegt dagegen um den Faktor 3,6 niedriger als bei dem Hexa-His-THPA-Fusionsprotein (Abb. 31). Dies könnte durch die N-terminale Modifikation der Primärstruktur des Hexa-His-THPA-Fusionsproteins erklärt werden. Zu dem lag das Wildtypprotein nicht homogen vor, so daß unerwünschte Nebenreaktionen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

### 5.5.1.3. Expression von *thpD* in *E. coli* M15 als Hexa-His-Fusionsprotein

Es wurde vermutet (5.3.4.), daß der ORF *thpD* möglicherweise für eine Hydroxylase kodiert, welche die Konversion von THP(B) in THP(A) katalysiert. Um dies zu belegen, wurde *thpD* in *E. coli* M15 exprimiert. Dazu wurde *thpD* als *Bam*HI/*Hind*III-PCR-Fragment hinter den *lacZ* Promotor in den Expressionsvektor pQE30 kloniert (4.6.1.5.). Eine Expression sollte zu einem nativen THPD-Protein mit einer N-terminalen Hexa-His-Sequenz führen. Nach der Induktion der Genexpression mit IPTG und anschließendem Zellaufschluß konnte im zellfreien Rohextrakt eine deutliche Produktion des Hexa-His-THPD-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel festgestellt werden (Abb. 33). Getrennte Untersuchungen der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen ergaben, daß das Protein überwiegend in unlöslicher Form, als sogenannte „Inclusion bodies“, in den *E. coli* M15 Zellen vorlag. Änderungen der Anzuchtstemperatur (30°C statt 37°C) bzw. der IPTG Konzentration (0,1 mM - 1 mM) bei der Induktion erbrachten keine Verbesserung der Löslichkeit des Proteins.



**Abb. 33: Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel.**

Spur 1: Marker, Spur 2: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 vor der Induktion (100 µg), Spur 3: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpD vor der Induktion (100 µg), Spur 4: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 1 h nach der Induktion mit 1 mM Imidazol (120 µg), Spur 5: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpD 1 h nach der Induktion (150 µg), Spur 6: Löslicher Proteinanteil von Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpD 1 h nach der Induktion (90 µg), Spur 7: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 2 h nach der Induktion mit 1 mM Imidazol (120 µg), Spur 8: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpD 2 h nach der Induktion (150 µg), Spur 9: Löslicher Proteinanteil von Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpD 2 h nach der Induktion (80 µg). Inkubationstemperatur: 37°C (4.1.1.).

Die Aufreinigung des löslichen Hexa-His-THPD-Fusionsproteins erfolgte durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Matrix (4.9.2.1.). Dabei war im SDS-Polyacrylamidgel zu beobachten, daß bei der Elution mit 30 mM bzw. 50 mM Imidazol neben dem zu erwartenden Protein noch viele unspezifisch gebundene Proteine eluierten. Der Nachweis, daß es sich bei der Proteinbande im Bereich von 33 kDa um das Hexa-His-THPD-Fusionsprotein handelte, erfolgte schließlich immunologisch unter Verwendung des PentHis-Antikörpers der Firma Qiagen (4.11.4.) (nicht gezeigt).

#### **5.5.1.4. Untersuchung des in *E. coli* M15 gebildeten Hexa-His-THPD-Fusionsproteins**

Bei der Hydroxylase THPD könnte es sich um eine  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase handeln (5.3.4.). Solche Enzyme benötigen als Cofaktor  $\text{Fe}^{2+}$ . Eine Erhöhung der Enzymaktivität wurde bei verschiedenen Dioxygenasen *in vitro* festgestellt, wenn im Reaktionsansatz Ascorbinsäure vorhanden war [Mori *et al.*, 1997]. Die Ascorbinsäure dient dabei zur Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$ .

Für die Hydroxylierung von THP(B) durch das Hexa-His-THPD-Fusionsprotein wurden 10 mM THP(A) in Gegenwart von 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM  $\text{FeSO}_4$  und 2 mg/ml Protein bei 30°C für 30 Minuten inkubiert (4.10.4.). Als Proteinproben wurden die auf einer Sephadex PD10 Säule entsalzten Fraktionen, die bei 30 mM bzw. 50 mM Imidazol von der Ni-NTA-Matrix eluierten, verwendet. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95°C für 1 min beendet. Jeweils 1/10 des Reaktionsansatzes wurde auf einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-HPLC-Säule aufgetrennt. Die Bildung von THP(A) konnte nicht beobachtet werden. Für dieses Ergebnis kommen mehrere Gründe in Frage. Zum einen könnte das *thpD* Gen nicht für die THP(B)-Hydroxylase kodieren, oder es werden für die Hydroxylierung andere Substrate bzw. Cofaktoren benötigt. Die nicht korrekte Faltung des Proteins in *E. coli* M15 bzw. das Stören der Hexa-His-Sequenz bei der Proteinfaltung könnten weitere Gründe sein. Aus diesem Grunde wurde die Expression von *thpD* in *E. coli* M15 ohne Hexa-His-Sequenz vorgenommen.

### 5.5.2. Expression von *thpD* in *E. coli* M15 ohne Hexa-His-Tag

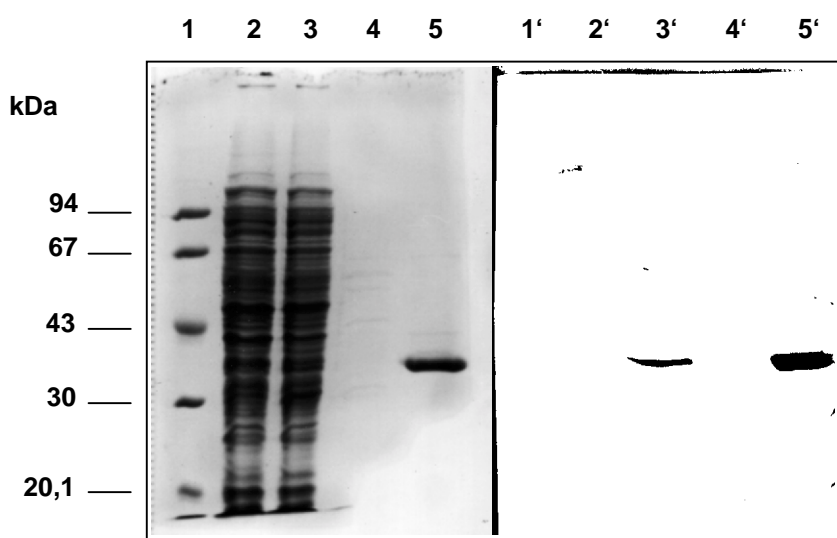
Zur Expression von *thpD* in *E. coli* M15 wurde dieses Gen als *Bam*HI/*Hind*III-PCR-Fragment hinter den *lacZ* Promotor in den Expressionsvektor pQE50 kloniert (4.6.1.6.). Die Induktion der Genexpression erfolgte wie im Fall des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins mit 1 mM IPTG und einer Anzuchtstemperatur von 37°C. Nach der Induktion und anschließendem Zellaufschluß konnte, wie bei dem Hexa-His-THPD-Fusionsprotein, im zellfreien Rohextrakt eine deutliche Produktion des THPD-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel festgestellt werden (nicht gezeigt). Getrennte Untersuchungen der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen ergaben, daß THPD auch ohne N-terminale Hexa-His-Sequenz überwiegend in unlöslicher Form in den *E. coli* M15 Zellen vorlag. Eine Variation der Anzuchtstemperatur (30°C statt 37°C) bzw. der IPTG Konzentration (0,1 mM bis 1 mM) bei der Induktion erbrachte keine Verbesserung der Löslichkeit des Proteins.

Die Testung des Enzyms wurde sowohl mit entsalztem Rohextrakt als auch mit durch Ammoniumsulfat-Präzipitation aufkonzentriertem Enzym durchgeführt. Auch bei diesem Ansatz konnte keine Bildung von THP(A) nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde beschlossen, das *thpD* Gen in *Streptomyces lividans* zu exprimieren, da Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt hatten, daß auch heterologe Proteine in diesem Streptomyceten nativ gefaltet werden.

### 5.5.3. Expression von *thpD* als Hexa-His-Fusionsprotein in *Streptomyces lividans*

Nachdem die heterologe Expression von *thpD* in *E. coli* M15 nicht zu katalytisch aktivem Enzym geführt hatte, wurde *thpD* in *S. lividans* exprimiert, da hier die selben Faltungsmechanismen wie im natürlichen Wirt wirksam seien sollten. Durch PCR wurde mit pQE30*thpD* als Matrize ein *Sph*I/*Hind*III Fragment gebildet, das in den Expressionsvektor pSPIJ002 kloniert wurde (4.7.1.2.). Das *Sph*I/*Hind*III Fragment besitzt am 5'-Ende eine Basensequenz, die für sechs Histidine kodiert. Das erhaltende Plasmid erhielt die Bezeichnung pSPIJ*thpD*. Nach Transformation von pSPIJ*thpD* in *S. lividans* wurde dieser 72 h in YEME-Medium, welches 5 µg/ml Thiostrepton enthielt, kultiviert (4.1.3.). Der Extrakt von Mycelium (ca. 9 g Feuchtgewicht) aus einem Liter Kultur wurde durch Ni-NTA-Matrix-Chromatographie fraktioniert. Abbildung 34 zeigt, daß von der

Matrix lediglich ein Hauptprotein im Bereich von 50-100 mM Imidazol mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa eluiert. Dies stimmt mit der erwarteten Größe (34,1 kDa) des Hexa-His-Fusionsproteins überein. Als Kontrolle wurde *S. lividans* mit dem Plasmid pIJ702 transformiert. Die Kultivierung sowie die Proteinpräparation erfolgte wiederum unter den oben angegebenen Bedingungen. Im Unterschied zu dem pSPIJthpD tragenden *S. lividans* ist keine Proteinbande im Größenbereich von 35 kDa auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu beobachten. Der Nachweis, daß es sich bei dem 35 kDa Protein um ein Fusionsprotein handelt, erfolgte durch Immunoblot-Analyse unter Verwendung des PentaHis-Antikörpers der Firma Qiagen (Abb. 34).



**Abb. 34: Coomassie gefärbtes 10%iges SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot-Analyse.**

Wachstumsbedingungen: 72 h bei 28°C

Spur 1: Marker, Spur 2: Zellextrakt von *S. lividans* pIJ702 (170 µg), Spur 3: Zellextrakt von *S. lividans* pSPIJthpD (170 µg), Spur 4: 100 mM Imidazol Fraktion von *S. lividans* pIJ702 (5 ng), Spur 5: 100 mM Imidazol Fraktion von *S. lividans* pSPIJthpD (1 µg)

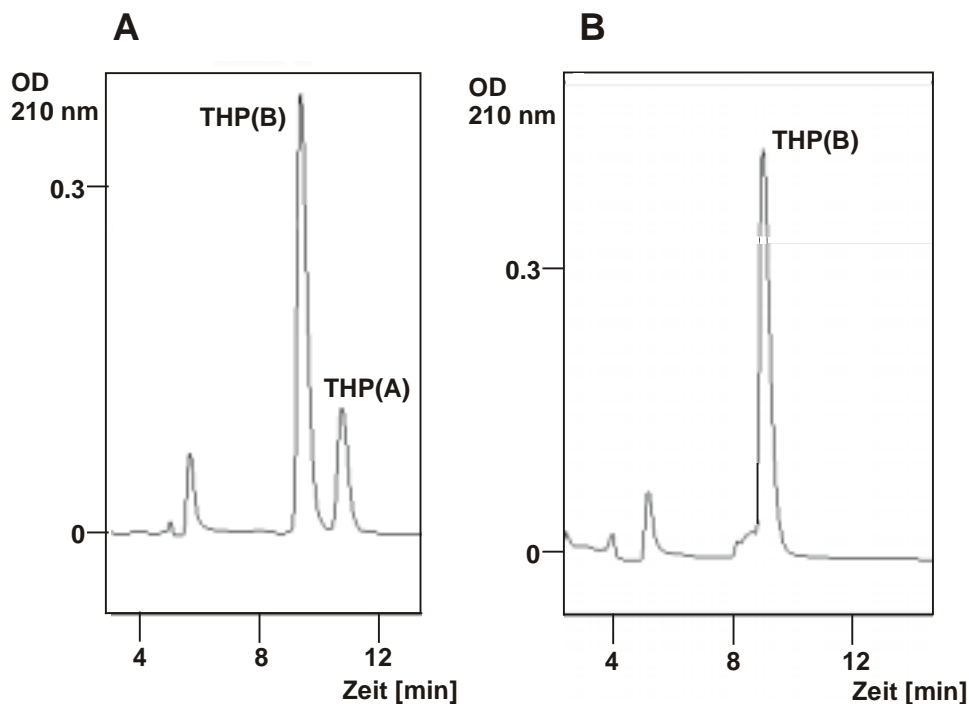
Spur 1'-5': Western-Blot der Spuren 1-5 unter Verwendung des PentaHis-Antikörpers der Firma Qiagen (Verdünnung 1:3000) (4.11.4.).

#### **5.5.3.1. Untersuchung des in *Streptomyces lividans* gebildeten Hexa-His-THPD- Fusionsproteins**

Die Untersuchung des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins aus *S. lividans* erfolgte in Gegenwart von 5 mM THP(B), 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM FeSO<sub>4</sub> und einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml bei 30°C für 30 Minuten. Das von der Ni-NTA-Matrix eluierte Enzym wurde zuvor auf einer Sephadex G25M PD10 Säule entsalzt. Im Kontrollansatz wurde das Enzym durch Puffer ersetzt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95°C für 1 min beendet.



Jeweils 1/10 des Reaktionsansatzes wurde auf einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-HPLC Säule aufgetrennt. Dabei wurde eine neue Verbindung, die eine Absorption bei 210 nm aufwies, detektiert (Abb. 35). Diese neue Verbindung wies die gleiche Retentionszeit wie das authentische THP(A) auf. Die massenspektroskopische Untersuchung ergab den zu erwartenden Massenpeak von THP(A).



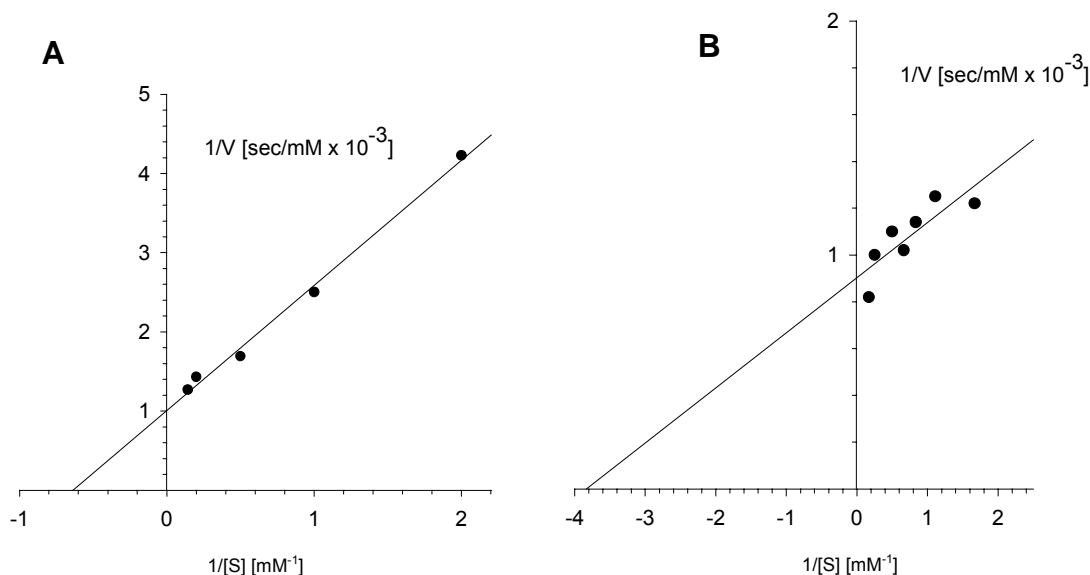
**Abb. 35: HPLC von THP(A) und THP(B) an einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-Säule.**

Jeweils 1/10 des Reaktionsansatzes, der 5 mM THP(B), 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM  $\text{FeSO}_4$  und 2 mg/ml THPD-Fusionsprotein (A) bzw. Puffer D (B) enthielt, wurde aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 70% Acetonitril bei einer Flußrate von 1 ml/min (4.10.4.).

Bei Verwendung von L-Prolin bzw. L-Pipecolinsäure als Substrat konnte keine Hydroxylierung nachgewiesen werden, dies schließt aus, daß es sich um eine Prolin-Hydroxylase handelt.

### 5.5.3.2. Messung der kinetischen Parameter der Hydroxylierungsreaktion

Die Vermessung des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins ergab einen  $K_m$ -Wert von 1,56 mM für THP(B) und 0,26 mM für  $\alpha$ -Ketoglutarat (Abb. 36). Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie sie für die Prolin-3-Hydroxylase aus *Streptomyces* sp. Stamm TH1 gefunden wurden (0,56 mM für Prolin und 0,11 mM für  $\alpha$ -Ketoglutarat) [Mori, H. *et al.*, 1997].



**Abb. 36: Bestimmung der  $K_m$ -Werte für das Hexa-His-THPD-Fusionsprotein aus *S. lividans*.**

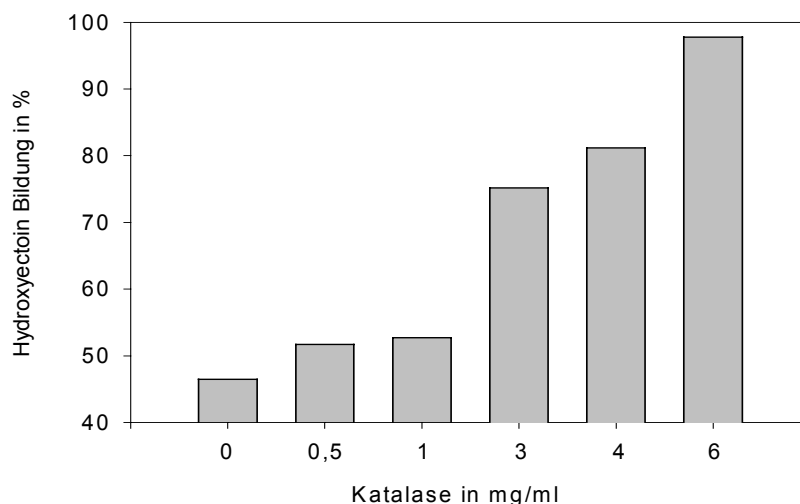
- A: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der THP(B) Konzentration (5 mM 2-Ketoglutarat im Reaktionsansatz).  
 B: Doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der  $\alpha$ -Ketoglutarat Konzentration (10 mM THP(B) im Reaktionsansatz).

### 5.5.3.3. Einfluß von Ascorbinsäure und Katalase auf die Hydroxylierung von THP(B)

Ascorbinsäure (1 mM) stimuliert die Hydroxylierung von THP(B) signifikant. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Ascorbinsäure ist die Stimulation 4fach. Eine Erhöhung der Ascorbinsäurekonzentration über 5 mM brachte keine weitere Steigerung der THP(A)-Bildung. Dies stimmt mit Beobachtungen bei anderen Dioxygenasen, wie z.B. bei der Prolin-3-Hydroxylase aus *Streptomyces* sp. Stamm TH1 überein [Mori, H. *et al.*, 1997].

Da bei der enzymatischen Aktivität von Dioxygenasen  $H_2O_2$  entsteht, könnte beim Einsatz einer Katalase, ein Enzym das  $H_2O_2$  spaltet, eine Optimierung der THP(A) Bildung erreicht werden. Aus diesem Grunde wurde bei dieser Hydroxylierungsreaktion eine zunehmende Konzentration an Katalase

eingesetzt. Wie aus Abb. 37 zu erkennen ist, wird die Bildung von THP(A) stimuliert.



**Abb. 37: Einfluß der Katalase auf die Hydroxylierung von THP(B).**

Zunehmende Konzentrationen der Katalase wurden dem Reaktionsansatz, der 5 mM THP(B), 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM  $\text{FeSO}_4$  und 2 mg/ml Hexa-His-THPD-Fusionsprotein aus *S. lividans* enthielt, zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 30°C. 1/10 des Reaktionsansatzes wurde auf einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-HPLC-Säule aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Peakflächen.

Bei einer Katalasekonzentration von 6 mg/ml wurde THP(B) vollständig hydroxyliert. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität dieses Katalase-Präparats (4200 Units/mg) wurde im Vergleich zu anderen Dioxygenasen eine relativ hohe Konzentration an Katalase benötigt [Mori *et al.*, 1997].

#### **5.5.3.4. Stabilität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins aus *S. lividans***

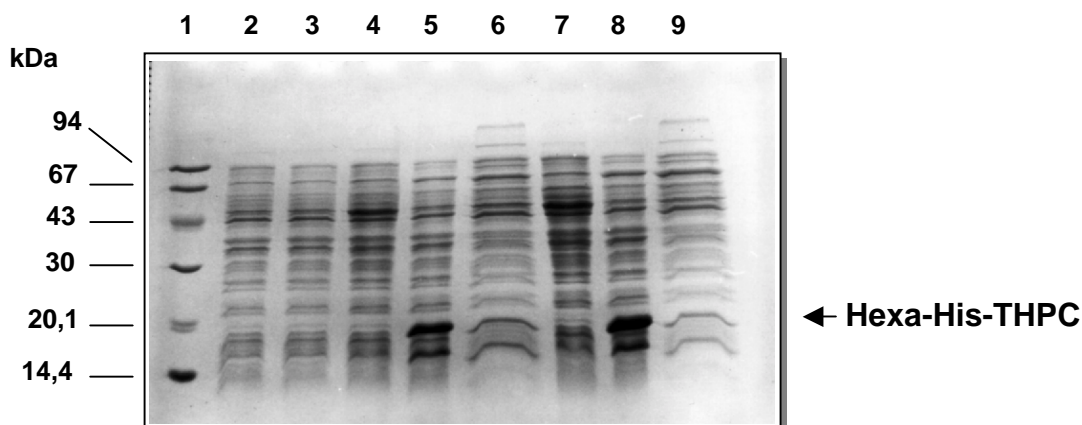
Zur Überprüfung der Stabilität des Enzyms, wurde das Hexa-His-THPD-Fusionsprotein aus *S. lividans* über mehrere Stunden bei 0°C in Puffer F (50 mM Tris-HCL pH 8,0; 10% Glycerol) gelagert (4.10.6.). Nach 0, 8 und 16 Stunden wurde ein Anteil entnommen und die Hydroxylaseaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, daß nach 16 Stunden nur noch 58% der ursprünglichen Aktivität vorhanden war.

Darüber hinaus wurde der stabilisierende Einfluß von THP(B) auf das Hexa-His-THPD-Fusionsprotein aus *S. lividans* getestet. Dazu wurde das Enzym in Gegenwart von 10 mM THP(B) für 0, 1, 2 und 4 Stunden bei 30°C präinkubiert. Danach wurde wie unter 5.5.3.1. beschrieben die Hydroxylaseaktivität bestimmt.

Nach einer Präinkubationszeit von 1 h waren noch rund 32% der ursprünglichen Hydroxylaseaktivität vorhanden. Jedoch konnte bei einer längeren Inkubationszeit keine weitere Abnahme der Hydroxylaseaktivität festgestellt werden. Bei den Kontrollansätzen, die bei der Präinkubation kein THP(B) enthielten, wurde nach vier Stunden noch 24% der ursprünglichen Hydroxylaseaktivität gefunden. Damit konnte, wie bei dieser geringen THP(B)-Konzentration zu erwarten gewesen war, nur eine geringe Stabilisierung des Proteins erreicht werden. Die THP(B) Konzentrationen wurden nicht weiter erhöht, da nur getestet werden sollte, ob bei der standardmäßig verwendeten THP(B)-Konzentration eine Stabilisierung erreicht werden konnte. Es ist daher nicht auszuschließen, daß wie bei ähnlichen Stabilisierungsexperimenten, bei denen das THP(B) in der Größenordnung von 1 M eingesetzt wurde, eine signifikante Stabilisierung stattfindet [Lippert und Galinski, 1992].

#### **5.5.4. Expression von *thpC* in *E. coli* M15 als Hexa-HIS-Fusionsprotein**

*ThpC* kodiert höchstwahrscheinlich für die AcDABA-Cyclase (THP(B)-Synthase) (5.3.3.). Zur Überprüfung dieser Annahme wurde versucht, das Gen in *E. coli* M15 als Hexa-His-Fusionsprotein zu exprimieren. Dazu wurde *thpC* als *Bam*HI/*Hind*III-PCR-Fragment hinter den *lacZ* Promotor in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Das Expressionsplasmid wurde als pQE30*thpC* bezeichnet. Die Induktion erfolgte analog des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins. Nach der Induktion und anschließendem Zellaufschluß konnte im zellfreien Rohextrakt eine deutliche Produktion des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins anhand der Intensität seiner Bande im SDS-Polyacrylamidgel festgestellt werden. Getrennte Untersuchungen der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen ergaben, daß das Protein überwiegend in unlöslicher Form in den *E. coli* Zellen vorlag (Abb. 38).



**Abb. 38: Coomassie gefärbtes 15%iges SDS-Polyacrylamidgel.**

Spur 1: Marker, Spur 2: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 vor der Induktion (100 µg), Spur 3: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpC vor der Induktion (100 µg), Spur 4: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 1 h nach der Induktion mit 1 mM Imidazol (120 µg), Spur 5: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpC 1 h nach der Induktion (150 µg), Spur 6: Löslicher Proteinanteil von Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpC 1 h nach der Induktion (90 µg), Spur 7: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30 2 h nach der Induktion mit 1 mM Imidazol (120 µg), Spur 8: Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpC 2 h nach der Induktion (150 µg), Spur 9: Löslicher Proteinanteil von Zellextrakt aus *E. coli* M15 pQE30thpC 2 h nach der Induktion (80 µg). Inkubationstemperatur: 37°C.

Eine Änderung der Anzuchtstemperatur (30°C statt 37°C) bzw. der IPTG Konzentration (0,1 mM - 1 mM) bei der Induktion erbrachte keine Verbesserung der Löslichkeit des Proteins.

#### **5.5.4.1. Aktivitätsanalyse des THPC-Fusionsproteins**

Das Gen *thpC* kodiert wahrscheinlich für die AcDABA-Cyclase (5.3.3.). Es wurde daher versucht, N-γ-Acetyl-DABA enzymatisch mit Hilfe des löslichen Anteils des Enzyms zu THP(B) umzusetzen. Als Substrat wurde N-γ-Acetyl-DABA, das durch Umsetzung von AcCoA und DABA mit dem Hexa-His-THPA-Fusionsprotein gebildet wurde, verwendet. Durch Einsatz von <sup>14</sup>C-AcCoA stand darüber hinaus <sup>14</sup>C-N-γ-Acetyl-DABA zur Verfügung. Dies ermöglichte einen sensitiveren Nachweis von evtl. gebildetem THP(B) als der Nachweis von THP(B) auf Dünnschichtplatten durch Ansprühen mit Dragendorf Reagenz, wo erst ab 0,5 µmol THP(B) nachweisbar war. Neben dem enzymatisch gebildeten N-γ-Acetyl-DABA wurde auch chemisch synthetisiertes N-γ-Acetyl-DABA eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM N-γ-Acetyl-DABA und verschiedene Mengen des Hexa-His-THPC-Fusionsproteins. Die Inkubationszeit wurde von 10 bis 60 Minuten variiert. Auch eine Änderung der Inkubationstemperatur

wurde vorgenommen (15°C, 20°C, 25°C und 30°C). Die Analyse des Reaktionsgemisches erfolgte dünnschichtchromatographisch mit verschiedenen Laufmitteln. Es konnte jedoch in keinem der Reaktionsansätze eine Bildung von THP(B) nachgewiesen werden.

#### 5.5.5. Expression von *thpC* in *E. coli* M15 ohne Hexa-His-Tag

Da nicht auszuschließen war, daß die Hexa-His-Sequenz des oben beschriebenen Konstrukts einen störenden Einfluß hat, wurde das Gen *thpC* ohne eine Hexa-His kodierende Sequenz als *Bam*HI/*Hind*III-PCR-Fragment hinter den *lacZ* Promotor in den Expressionsvektor pQE50 kloniert (4.6.1.5.). Die Induktion der *E. coli* M15 Zellen erfolgte wie im Fall des Hexa-His-THPC-Fusionsproteins. Auch bei diesem Konstrukt war im SDS-Polyacrylamidgel eine deutliche Überproduktion des THPC-Proteins zu erkennen. Aber wie im Fall des Hexa-His-THPC-Fusionsproteins war der überwiegende Anteil des THPC-Proteins unlöslich. Optimierungen in Bezug auf die IPTG-Konzentration bzw. der Anzuchtstemperatur führten zu keinem Anstieg des löslichen Anteils.

Für die Tests wurden zum einen entsalzter Rohextrakt und zum anderen durch Ammoniumsulfat Präzipitation aufkonzentriertes Enzym eingesetzt. Die übrigen Bedingungen entsprachen den unter 5.5.4.1 beschriebenen. Auch in diesem Fall konnte die Bildung von THP(B) nicht nachgewiesen werden.

#### 5.5.6. Expression von *thpC* als Hexa-His-Fusionsprotein in *Streptomyces lividans*

Da die heterologe Expression von *thpC* in *E. coli* M15 zu keinem aktiven Enzym geführt hatte, wurde versucht, *thpC* in *S. lividans* zu exprimieren, sowie dies im Fall von *thpD* bereits erfolgreich praktiziert worden war. Durch PCR wurde mit pQE30*thpC* als Matrize ein *Sph*I/*Hind*III Fragment gebildet, daß dann in den Expressionsvektor pSPIJ002 kloniert wurde (4.7.1.1.). Das *Sph*I/*Hind*III-Fragment besitzt am 5'-Ende eine Basensequenz, die für sechs Histidine kodiert. Das Expressionsplasmid erhielt die Bezeichnung pSPIJ*thpC*. Eine Expression des Gens sollte bei diesem Plasmidkonstrukt zu einem Hexa-His-THPC-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 16,3 kDa führen.

Nach Transformation von pSPIJ*thpC* in *S. lividans* wurde dieser für 72 h in YEME-Medium, welches 5 µg/ml Thiostrepton enthielt, kultiviert. Der Extrakt

von Mycelium (ca. 9 g Feuchtgewicht) aus 1 l Kultur wurde auf einer Ni-NTA-Matrix chromatographiert. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Stufengradienten eluiert. Dabei kam es nicht zur Elution eines Proteins, sondern es eluierten eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher Größe.

Als Kontrolle wurde *S. lividans* mit dem Plasmid pIJ702 transformiert. Die Kultivierung sowie die Proteinpräparation erfolgte parallel zu pSPIJthpC unter den oben angegebenen Bedingungen. Auch in diesem Fall kam es, wie im folgenden noch gezeigt wird, zur Elution einer Vielzahl von Proteinen.

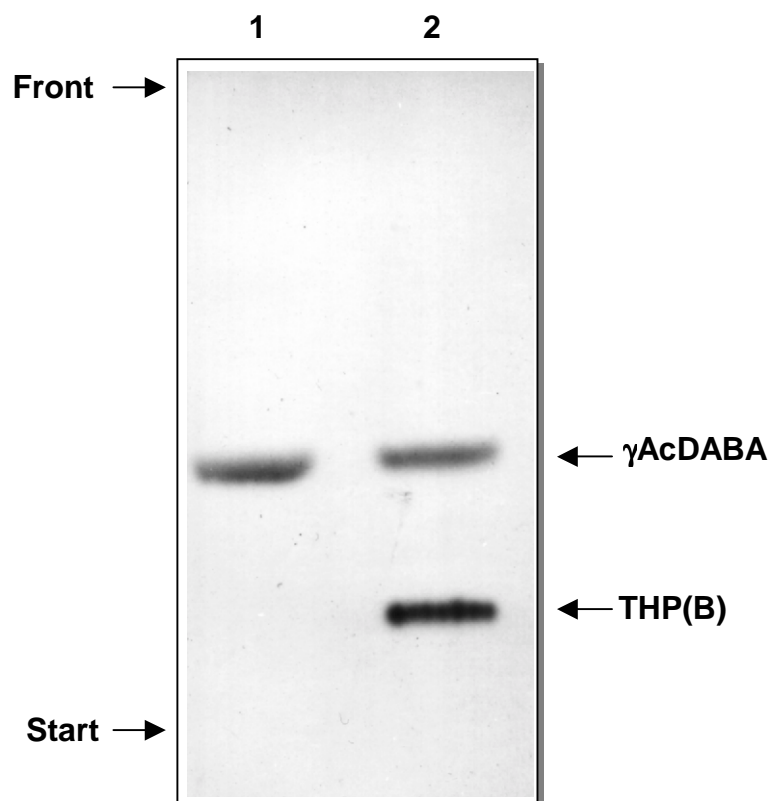
Der Nachweis der Hexa-His-Sequenz durch Immunoblot-Analyse fiel negativ aus. Es ist bekannt, daß es in seltenen Fällen zum Verlust der Hexa-His-Sequenz, z.B. durch Protease Aktivität, kommen kann. Daher wurden im Folgenden sowohl die von der Ni-NTA-Matrix eluierenden als auch die nicht an der Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteine auf eine THP(B)-Synthase Aktivität getestet.

#### **5.5.6.1. Nachweis einer AcDABA-Cyclase Aktivität aus *S. lividans***

Wie im folgenden gezeigt wird, konnte sowohl bei dem Stamm mit pSPIJthpC als auch beim Stamm mit pIJ702 eine AcDABA-Cyclase Aktivität gefunden werden. Es ist daher anzunehmen, daß es sich um eine endogene AcDABA-Cyclase Aktivität handelt.

Für den Nachweis einer AcDABA-Cyclase Aktivität wurde radioaktives  $^{14}\text{C}$ -N-Acetyl-DABA mit den entsalzten Fraktionen, die vorher von der Ni-NTG-Säule eluiert waren, für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Produktanalyse erfolgte dünnschichtchromatographisch mit authentischen THP(B) als Referenz (Abb. 39). Eine THP(B)-Synthase-Aktivität wurde sowohl im Durchfluß der Ni-NTA-Säule als auch im 30 mM Eluat gefunden.

Das entstandene neue Produkt hatte den gleichen  $R_f$ -Wert wie das authentische THP(B). Es stellte sich heraus, daß im Durchfluß sowie in den von der Ni-NTA-Matrix eluierten Proteinfractionen des Kontrollstammes (*S. lividans* pIJ702), ebenfalls eine AcDABA-Cyclase Aktivität festgestellt werden konnte. Die Gesamtaktivitäten der beiden *S. lividans* Stämme unterschieden sich nicht, was darauf hindeutet, daß es sich bei der möglichen AcDABA-Cyclase um das Wildtypenzym handelt.

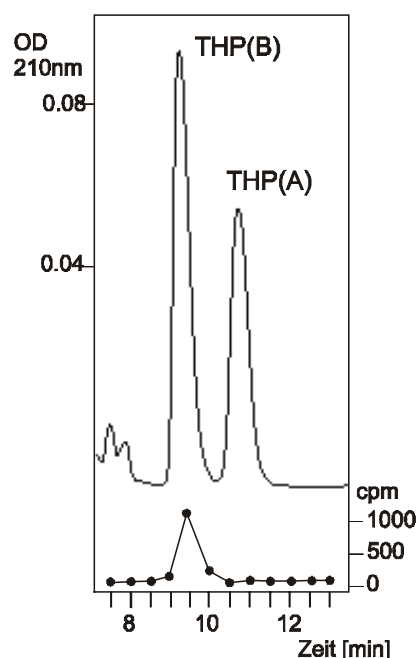


**Abb. 39: Autoradiogramm einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Reaktionsprodukte der AcDABA-Cyclase**

AcDABA-Cyclase (100 ng Gesamtprotein) wurde in Gegenwart von 0,05  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -N- $\gamma$ -Acetyl-DABA in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  bei 30°C für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes auf eine Kieselgel 60-Platte aufgetragen. Als Laufmittel wurde isoPropanol: $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) = 7:3 verwendet. Die radioaktiven Produkte wurden mittels Autoradiographie detektiert. Spur 1: (Ref.), Spur 2: Reaktionsansatz. Als Referenz wurde authentisches THP(B) verwendet, das durch Ansprühen der DC-Platte mit Dragendorff-Reagenz detektiert wurde.

Zur Absicherung der Identität des radioaktiven Produkts mit THP(B) wurde das Material nach der Inkubation auf einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-HPLC-Säule chromatographiert. Dazu wurde das potentielle  $^{14}\text{C}$ -THP(B) mit authentischen, nicht markierten THP(B) und THP(A) vermischt und anschließend chromatographiert. Die Elution erfolgte mit 70% Acetonitril bei einer Fraktionsgröße von 500  $\mu\text{l}$ . Die Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillationszählung gemessen. Das Elutionsprofil ist in Abb. 40 dargestellt. Dabei ist zu beobachten, daß die radioaktive Verbindung die gleiche Retentionszeit, wie das authentische THP(B) aufweist (Abb. 40).

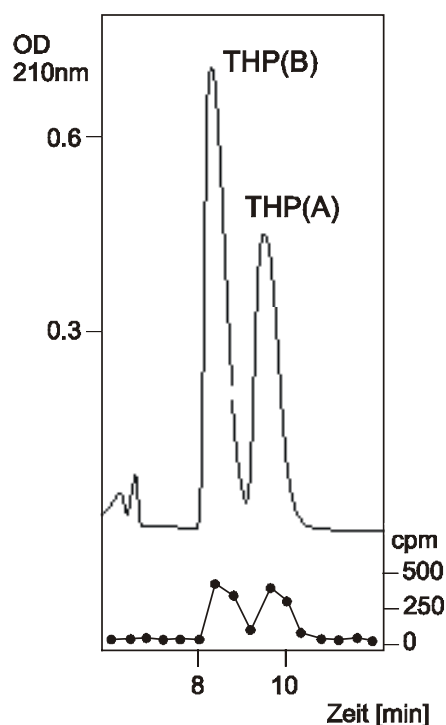




**Abb. 40: Auftrennung von THP(A) und THP(B) durch HPLC an einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-Säule.**

Durch Umsetzung von  $^{14}\text{C}$ -N- $\gamma$ -Acetyl-DABA und putativer AcDABA-Cyclase erhaltenes  $^{14}\text{C}$ -THP(B) wurde mit authentischen THP(A) und THP(B) gemischt und auf eine  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 70% Acetonitril. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Flüssigszintillationszählung.

Zur weiteren Bestätigung der Identität des radioaktiven Produktes mit authentischen THP(B) wurde dieses mit dem Hexa-His-THPD-Fusionsprotein aus *S. lividans* umgesetzt, um es durch Hydroxylierung in THP(A) zu konvertieren. Dazu wurde das potentielle  $^{14}\text{C}$ -THP(B) in Gegenwart von 5 mM THP(B), 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM  $\text{FeSO}_4$  und dem Hexa-His-THPD-Fusionsprotein (1 mg/ml) bei 30°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte auf einer  $\text{NH}_2$ -Nucleosil-Säule chromatographiert. Das Elutionsprofil ist in Abb. 41 dargestellt. Wie aus der Abb. 41 zu erkennen ist, kam es nun zur Elution von zwei verschiedenen radioaktiven Produkten. Diese stimmen in ihren Retentionszeiten mit denen vom THP(B) und THP(A) überein. Damit zeigte sich, daß das potentielle THP(B) zu THP(A) hydroxyliert werden konnte. Aus diesen Ergebnissen ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich bei der neuen Verbindung, die bei der Inkubation von  $^{14}\text{C}$ -N- $\gamma$ -Acetyl-DABA in Gegenwart von dem THPC-Enzym entstanden ist, um  $^{14}\text{C}$ -THP(B) handelt.



**Abb. 41: Auftrennung von THP(A) und THP(B) durch HPLC an einer NH<sub>2</sub>-Nucleosil-Säule.**

Die Hydroxylierung erfolgte durch Inkubation von <sup>14</sup>C-THP(B) in Gegenwart von 5 mM THP(B), 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM FeSO<sub>4</sub> und Hexa-His-THPD-Fusionsprotein (1 mg/ml) bei 30°C für 1 h. <sup>14</sup>C-THP(A) wurde mit authentischen THP(A) und THP(B) gemischt und auf eine NH<sub>2</sub>-Nucleosil-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch mit 70% Acetonitril. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Flüssigszintillationszählung.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß eine Vielzahl von Streptomyceten in der Lage sind THP(B) und THP(A) zu bilden [Malin und Lapidot, 1995]. Da es sich bei dem YEME-Medium, das 340 g Saccharose pro Liter enthält, um ein Medium handelt, das eine hohe Osmolarität ausweist, ist es sehr wahrscheinlich, daß es zur vermehrten Bildung von THP(B) kam und daher die AcDABA-Cyclase im Rohextrakt nachweisbar war. Dies gelang beim *S. chrysomallus* nicht, da sich dieser nicht in YEME-Medium kultivieren ließ.

#### **5.5.6.2. Aufreinigung der potentiellen AcDABA-Cyclase aus *S. lividans* pSPIJthpC**

Zur weiteren Aufreinigung der potentiellen AcDABA-Cyclase wurden die Proteine, die bei 30 mM Imidazol von der Ni-NTA-Matrix eluierten mit Ammoniumsulfat gefällt (Endkonzentration 65%). Das Ammoniumsulfatpräzipitat wurde in Puffer B aufgenommen und auf eine Superdex75pg-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die potentielle AcDABA-Cyclase eluierte nach 70

ml, was einer nativen Größe von ca. 30 kDa entspricht. Dies bedeutet, daß die potentielle AcDABA-Cyclase (16,3 kDa) als Dimer vorlag. Im SDS-Polyacrylamidgel konnte der Aktivität keine Proteinbande eindeutig zugeordnet werden. Eine Reinigung des Enzyms wurde nicht verfolgt.

#### **5.5.6.3. Überprüfung der Reversibilität der THP(B)-Bildung**

Um zu testen, ob die AcDABA-Cyclase auch in der Lage ist, die Rückreaktion der Cyclisierung von AcDABA (Abb.4) zu katalysieren, wurde partiell gereinigte AcDABA-Cyclase aus *S. lividans* pSPIJthpC mit verschiedenen THP(B) Konzentrationen bei 30°C für eine Stunde inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch und die Identifizierung von möglichem N- $\gamma$ -Acetyl-DABA durch die Ninhydrin Reaktion.

Bei allen Konzentrationen (1 mM, 5 mM und 10 mM Ectoin) konnte die Bildung von N- $\gamma$ -Acetyl-DABA nachgewiesen werden, bei der Kontrolle dagegen ohne Enzym nicht. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Peters *et al.* [1990] bei *Halomonas elongata* DSM 2581 überein. Im letzteren Fall wurde ebenfalls nur partiell aufgereinigtes Enzym verwendet. Ono *et al.* [1999] zeigten dagegen bei der zur Homogenität gereinigten AcDABA-Cyclase aus *Halomonas elongata* OUT30018, daß die Cyclisierung von AcDABA zu THP(B) nicht reversibel ist. Es ist daher noch nicht sicher, ob die Ringöffnung bei *S. chrysomallus* pSPIJthpC durch die AcDABA-Cyclase oder durch ein anderes Enzym katalysiert wird.

## 6. Diskussion

### 6.1. Isolierung und Charakterisierung der L-2,4-Diaminobuttersäure Acetyltransferase aus *Streptomyces chrysomallus*

In der vorliegenden Arbeit sollten die THP-Biosynthesegene aus *Streptomyces chrysomallus* identifiziert und analysiert werden. Frühere Arbeiten postulierten einen Zusammenhang zwischen der Bildung von THP(A/B) und der Actinomycin D Synthese [Inbar und Lapidot, 1988, 1991]. Bei der Analyse des Actinomycin D-Biosyntheseclusters, die parallel zu dieser vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe Keller erfolgte, wurden bisher jedoch keine Gene, die an der THP-Biosynthese beteiligt sind in den Peptidsynthetasen (ACMS I/II/III) flankierenden Bereichen (jeweils 4 kb) gefunden [Schauwecker *et al.*, 1998; Pfennig und Schauwecker, pers. Mitt.]. Es kann daher angenommen werden, daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Bildung von THP(A/B) und Actinomycin D besteht, da die Resistenzgene meistens mit dem zugehörigen Biosyntheseoperon geclustert vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt war auch noch nicht bekannt, daß die THP-Biosynthese etwas mit der Salzstressantwort in Streptomyceten zu tun haben könnte.

Da zu Beginn dieser Arbeit keine Sequenzen von Proteinen und Genen bekannt waren, mußte für die Klonierung der THP-Biosynthesegene aus *S. chrysomallus* direkt von einem Biosyntheseenzym ausgegangen werden. Aus enzymatischen Arbeiten von Peters *et al.* [1990] war bekannt, daß bei *Ectothiorhodospira halochloris* und *Halomonas elongata* die unmittelbare Vorstufe von THP(B) die N- $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure ist. Bei der alkalischen Hydrolyse von THP(B) entsteht neben der L-2,4-Diaminobuttersäure auch Acetat, was die obige Beobachtung bestätigen würde [Inbar und Lapidot, 1988]. Daher wurde, in Anlehnung an die bekannte L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (DABA-Acetyltransferase) aus *Halomonas elongata*, die DABA-Acetyltransferase aus *Streptomyces chrysomallus* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Aufreinigung der DABA-Acetyltransferase erwies sich als schwierig und konnte erst nach Optimierungen der Kultivierungsbedingungen erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigte sich, daß Mycelium aus Kulturen, die nach 36 h Wachstum in HMM-Medium mit konzentrierter NaCl-Lösung (Endkonzentration 0,5 M) versetzt worden waren, einen bis zu 15fach erhöhten Gehalt an DABA-

Acetyltransferase-Aktivität aufwiesen als Kulturen, bei denen kein Salzschock erfolgt war. Bei späteren Arbeiten konnte von Malin und Lapidot gezeigt werden, daß bei Streptomyceten die Bildung von THP(A) und THP(B) durch eine Erhöhung der Salzkonzentration im Medium stimuliert wird. Dies deutet auf die Rolle der THP-Biosynthese in der Salzstressantwort bei Streptomyceten und weniger auf die Selbstresistenz gegen DNA-bindende Stoffe hin [Malin und Lapidot, 1996]. Die in Tabelle 1 gezeigte Aufreinigung der DABA-Acetyltransferase aus *S. chrysomallus* erfolgte in sechs Schritten, wobei bei einer Ausbeute von 7% eine 186fache Aufreinigung erzielt wurde. Das Enzym konnte nicht zur Homogenität gereinigt werden, jedoch war es möglich, die Identität der DABA-Acetyltransferase durch Zuordnung der Proteinbande zur entsprechenden Enzymaktivität im letzten Chromatographieschritt zu ermitteln. Durch Edman-Abbau von Peptidfragmenten wurde sowohl die Peptidsequenz des N-Terminus als auch interne Peptidsequenzen bestimmt, welche durch einen tryptischen „im Gel-Verdau“, erhalten wurden. Von einer dieser Peptidsequenz wurden zwei Oligonukleotidsequenzen abgeleitet, die für das anschließende Screening einer Cosmidbank benutzt wurden.

## 6.2. Klonierung der DABA-Acetyltransferase

Das Gen der DABA-Acetyltransferase (*thpA*) wurde anschließend aus einer Cosmid-Genbank von *S. chrysomallus* kloniert und sequenziert. Das Protein wird von einem offenen Leserahmen (ORF) von 531 Basen kodiert, woraus eine molekulare Masse von 19,3 kDa resultiert. Durch Datenbankrecherchen konnten Ähnlichkeiten zu verschiedenen Acetyltransferasen gefunden werden. Die höchste Homologie wurde zu der zeitgleich publizierte L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase (ECTA) aus *Marinococcus halophilus* gefunden (Identität: 42%). Dieses Enzym ist Bestandteil der THP-Biosynthese in diesem halophilen Bakterium [Louis und Galinski, 1997]. Dies wies daraufhin, daß es sich bei *thpA* höchstwahrscheinlich um das gesuchte Gen der DABA-Acetyltransferase handelte. Auffällig ist der für Streptomyceten relativ niedrige Gesamt-G+C-Gehalt des kodierenden Bereichs von 68,5%. Üblicherweise werden hier Werte von über 70% erreicht. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß dieses Gen durch horizontalen Gentransfer von einem anderen Organismus auf die Streptomyceten erworben wurde. Da eine Clusterung der THP-Biosynthesegene

angenommen wurde, wurden die flankierenden Bereiche des Gens *thpA* sequenziert, um weitere THP-Biosynthesegene aufzufinden.

### 6.3. Analyse der weiteren THP-Biosynthesegene

Erwartungsgemäß folgten im 3'-Bereich auf *thpA* in gleicher Orientierung ein als *thpB* bezeichneter ORF. Dieser kodiert für ein mögliches Protein mit einem Molekulargewicht von 45,9 kDa. Datenbankrecherchen ergaben eine hohe Ähnlichkeit zu Transaminasen, die der Untergruppe II [nach Mehta *et al.*] zugeordnet werden. Die höchste Homologie wurde zu der L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase (ECTB) aus *Halomonas elongata* (Identität: 53%) gefunden, die ein vom *ectB* kodiertes Protein aus dem THP(B)-Biosynthescluster ist [Cánovas *et al.*, 1998]. Dies weist daraufhin, daß es sich bei *thpB* um das Gen der L-2,4-Diaminobuttersäure Transaminase aus *S. chrysomallus* handelt. Auch für *thpB* wurde ein für Streptomyceten relativ niedriger G+C-Gehalt des kodierenden Bereichs der DNA von 69,6% gefunden.

Nach *thpB* folgt im Abstand von 87 Basen der als *thpC* bezeichnete ORF. *ThpC* hat eine Länge von 399 Basen und kodiert für ein mögliches Protein mit einem Molekulargewicht von 14,9 kDa. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zur Ectoin-Synthase (AcDABA-Cyclase) aus *Marinococcus halophilus* (Identität: 39%). Offensichtlich kodiert *thpC* für die entsprechende AcDABA-Cyclase aus *S. chrysomallus*. Der G+C-Gehalt der DNA dieses kodierenden Bereichs liegt mit 64,7% erheblich niedriger als bei den anderen THP-Biosynthesegenen aus *S. chrysomallus*.

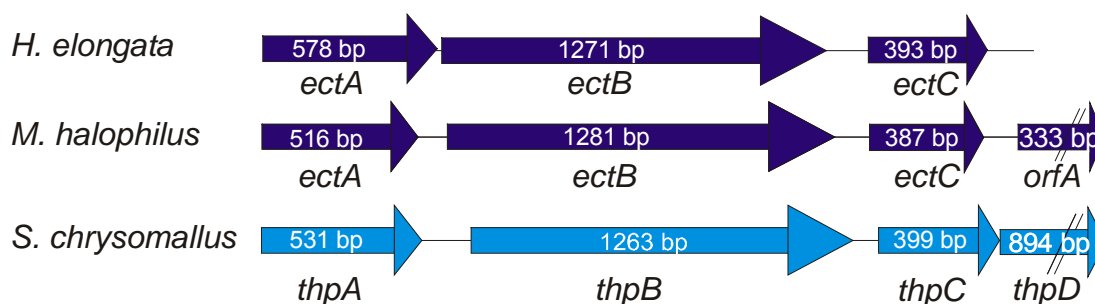
Der im Anschluß von *thpC* beginnende ORF *thpD* ist 894 Basen lang und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 32,7 kDa. Der G+C-Gehalt weist mit 68,0% wiederum einen für Streptomyceten ungewöhnlich niedrigen Wert auf. Es zeigt sich damit, daß alle THP-Biosynthesegene (*thpA*, *B*, *C*, *D*) einen für Streptomyceten ungewöhnlich niedrigen G+C-Gehalt der DNA aufweisen, was die Hypothese unterstützt, daß es sich bei den THP-Genen in ihrer Gesamtheit möglicherweise um durch Gentransfer aus anderen Mikroorganismen erworbene Gene handelt. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zu einer L-Prolin-4-Hydroxylase aus *Dactylosporangium* sp. (Identität: 30%) [Shibasaki *et al.*, 1995]. Dieses Enzym gehört zu der Klasse der  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Dioxygenasen. Das durch *thpD* kodierte Protein katalysiert, wie die weiter unten

diskutierte Expression von *thpD* in *S. lividans* als Hexa-His-Fusionsprotein belegt, die Bildung von THP(A) aus THP(B).

### 6.3.1. Organisation der THP-Gene in verschiedenen Mikroorganismen

Die Organisation und die Sequenzen von drei Ectoin-Biosynthesegenclustern (aus *Marinococcus halophilus*, *Halomonas elongata* DSM 3043 und aus *Halomonas* sp. KS-3) wurden bereits beschrieben [Cánovas *et al.*, 1997; Min-Yu *et al.*, 1993; Louis *et al.*, 1997].

Die Analyse dieser Gencluster ergab in allen Fällen die Anwesenheit von drei offenen Leserahmen (*ectA*, *ectB*, *ectC*), die für die Enzyme 2,4-Diaminobuttersäure-Transacetylase, 2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase und N-Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure-Cyclase (Ectoinsynthase) kodieren. Wie aus Abb. 42 zu erkennen ist, entspricht die Organisation der Gene *thpA*, *thpB* und *thpC* der in *H. elongata* und *M. halophilus*. Bei *S. chrysomallus* schließt sich aber nach *thpC* noch ein weiteres THP-Biosynthesegen, das *thpD* an. Die THP(B)-Hydroxylase (THPD) konnte in dieser Arbeit erstmalig identifiziert und charakterisiert werden. Der *orfA* bei *M. halophilus* ist nicht an der THP-Biosynthese beteiligt.



**Abb. 42: Vergleich des THP-Biosynthesegenclusters aus *Streptomyces chrysomallus* mit denen aus *Marinococcus halophilus* und *Halomonas elongata* DSM 3043.** *EctA* und *thpA* codiert für die L-2,4-Diaminobuttersäure-Acetyltransferase, *ectB*, *thpB* für die 2,4-Diaminobuttersäure-Transaminase, *ectC*, *thpC* für N-Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure-Cyclase (Ectoin-Synthase) und *thpD* für die THP(B)-Hydroxylase. *orfA* zeigt Ähnlichkeiten zu Transposons (IS-Elemente) und ist wahrscheinlich nicht an der THP(B) Biosynthese beteiligt. *ThpD* und *orfA* sind nicht vollständig dargestellt.

Die Transkription der drei Ectoin-Biosynthesegene bei *M. halophilus* erfolgt wahrscheinlich als ein singuläres Transkript [Louis und Galinski, 1997]. Auffällig ist auch, daß wie vor *ectA* aus *M. halophilus* auch vor *thpA* in *S. chrysomallus* eine Sequenzähnlichkeit zu einer  $\sigma^B$ -abhängigen Promotorsequenz aus *B. subtilis* gefunden wurde, so daß auch beim *S. chrysomallus* wahrscheinlich die Trans-

kription der THP-Biosynthesegene ebenfalls als singuläres Transkript erfolgen sollte. Promotorsequenzen zwischen den anderen THP-Biosynthesegenen konnten nicht identifiziert werden. Weitere transkriptionelle Analysen werden in Zukunft jedoch noch zur Bestätigung benötigt.

Die Expression des Ectoin-Genclusters von *M. halophilus* in *E. coli* führte zur osmoregulierten Biosynthese von Ectoin, was ein Wachstum von *E. coli* in Gegenwart von 5% NaCl ermöglichte [Louis and Galinski, 1997]. Analoge Befunde konnten bei der Expression des Ectoin-Genclusters von *Halomonas* sp. KS-3 festgestellt werden [Takano *et al.*, 1993]. Die Transformation der Ectoin-Biosynthesegene aus *Halomonas elongata* DSM3043 in *E. coli* führte dagegen nicht zur Biosynthese von Ectoin [Cánovas *et al.*, 1998]. Ebenso führte die Transformation der THP-Biosynthesegene aus *S. chrysomallus*, die u.a. auf dem 8,6 kb großen Cosmidfragment lokalisiert waren, in *E. coli* nicht zur Biosynthese von THP(A) oder THP(B). Dies läßt darauf schließen, daß es in *E. coli* nicht zur Expression der Gene kam. Es ist bekannt, daß Promotoren von Streptomyceten in *E. coli* sehr oft nicht aktiv sind.

#### 6.4. Analyse von *orfA*, *orfB*, *orfC* und *orfD*

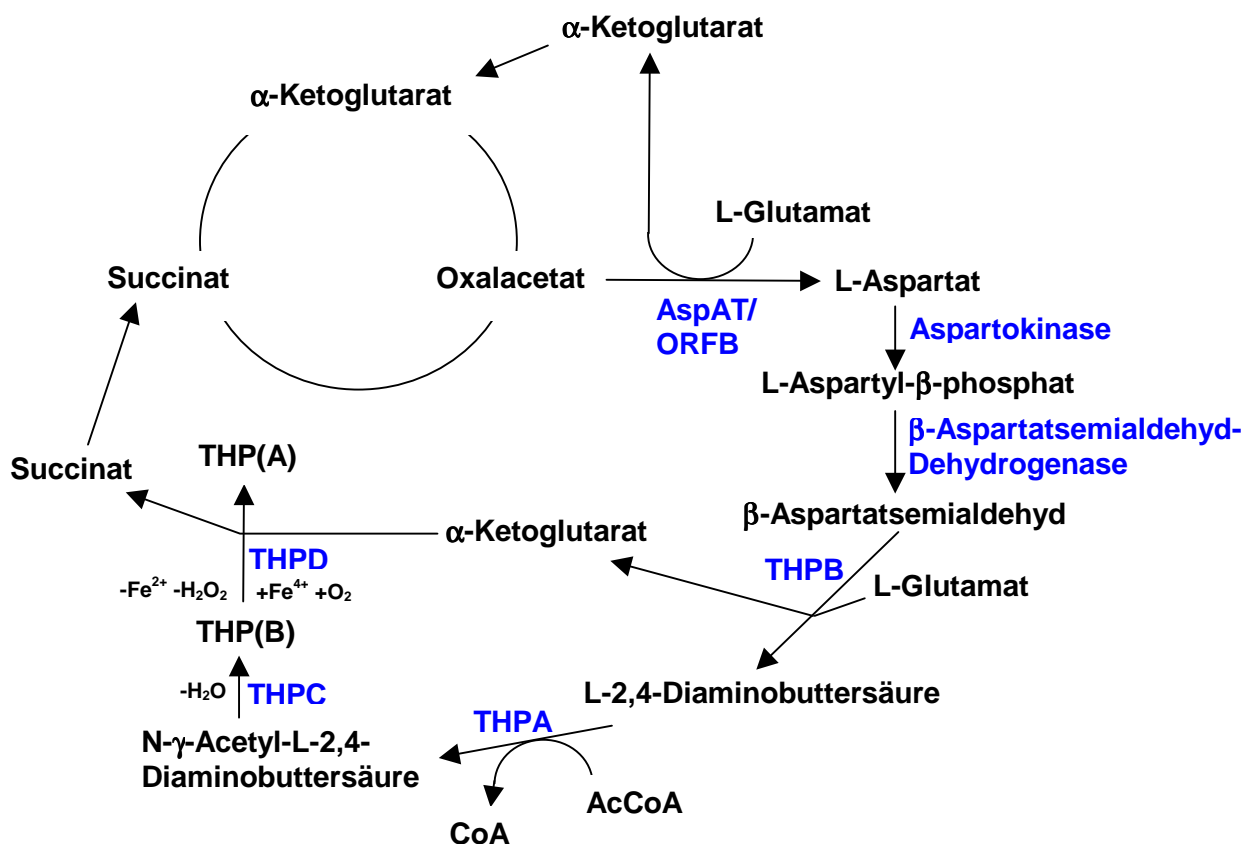
Die Abb. 11 zeigt, daß außer *thpA*, *thpB*, *thpC* und *thpD* auch die als *orfA*, *orfB*, *orfC* und *orfD* bezeichneten ORFs auf dem klonierten 8,6 kb Cosmidfragment gefunden wurden.

Die durch den *orfA*, der nicht mehr vollständig auf dem sequenzierten Cosmid lag, und die durch den *orfC* kodierten Proteine zeigten beim Vergleich mit Proteinsequenzen in Datenbanken keine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen.

Der *orfB*, der 309 Basen vor *thpA* endet, hat die gleiche Orientierung wie *thpA* und ist 1197 Basen lang. Er kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von 40,6 kDa. Der G+C-Gehalt dieses Bereichs erreicht mit 76,1% einen für Streptomyceten typischen Wert. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zu Aminotransferasen, die zu der Untergruppe IV [nach Mehta *et al.*, 1993] gehören. Zu dieser Untergruppe gehören u.a. die Serin-Aminotransferasen. Darüber hinaus wurde eine hohe Ähnlichkeit zu Aspartat-Aminotransferasen aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* [Tanaka *et al.*, 1994] und aus *Archaeoglobus fulgidus* [Klenk *et al.*, 1997] gefunden. Die Aspartat-Amino-



transferasen werden normalerweise zu der Untergruppe I der Aminotransferasen gezählt [Mehta *et al.*, 1993]. Aus Fütterungsversuchen mit  $^{14}\text{C}$ -L-Glutamat bei *Streptomyces parvulus* konnte gezeigt werden, daß das externe  $^{14}\text{C}$ -L-Glutamat aufgenommen wird und zu THP(A) verstoffwechselt wird [Inbar und Lapidot, 1991]. Dabei wurde angenommen, daß im Zitronensäurezyklus aus dem externen L-Glutamat Oxalacetat gebildet wird. Die Bildung von L-Aspartat (ein Vorläufer in der THP-Biosynthese) aus Oxalacetat wird durch eine Aspartat-Transaminase katalysiert. Diese Transaminierung könnte zum einen durch die Aspartat-Transaminase aus dem Aminosäurestoffwechsel oder zum anderen durch eine zusätzliche Aspartat-Transaminase katalysiert werden. Es ist daher möglich, daß *orfB* für eine Aspartat-Aminotransferase kodiert, die in der THP-Biosynthese involviert ist. Diese könnte den möglicherweise unter Salzstress vorhandenen Mangel an L-Aspartat zusätzlich durch dessen Synthese ausgleichen. Die an der THP-Biosynthese direkt bzw. indirekt beteiligten Biosyntheseschritte sind in Abb. 43 gezeigt.



**Abb. 43: Biosyntheseschritte, die an der Biosynthese von THP(A/B) direkt oder indirekt beteiligt sein könnten.** AspAT: Aspartat-Aminotransferase, THPA: Acetyltransferase, THPB: Aminotransferase, THPC: AcDABA-Cyclase, THPD: THP(B)-Hydroxylase

Darüber hinaus wurden auf dem sequenzierten Cosmid bisher keine Gene gefunden, die für eine Aspartokinase oder für eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase kodieren. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von  $\beta$ -Aspartatsemialdehyd aus Aspartat und müssen demnach im normalen Metabolismus vorhanden sein.

In entgegengesetzter Orientierung zu den THP-Genen befindet sich hinter dem *orfC* der 1074 Basen große *orfD*. Dieser kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 37,4 kDa. Der G+C-Gehalt liegt mit 71,1% in einem Bereich der für Streptomyceten typisch ist. Die Datenbankanalyse ergab eine hohe Ähnlichkeit zu der Glycerol-Trinitrat-Reduktase aus *Agrobacterium radiobacter* (Identität: 43%) [Snape *et al.*, 1997]. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine NADH-abhängige Oxidoreduktase, die wahrscheinlich nicht in der THP-Biosynthese involviert ist. Auffällig ist jedoch, daß eine mögliche Promotorsequenz gefunden wurde, die eine Ähnlichkeit zu der Promotorsequenz P1 von *proP* aus *E. coli* aufweist. *ProP*, kodiert für ein Osmolyten-Transporter und wird sowohl durch NaCl (0,3 M) als auch durch Aminosäuremangel aktiviert [Mellies *et al.*, 1994]. Es könnte daher sein, daß auch das von *orfD* abgeleitete Protein eine Funktion in der allgemeinen Salzstressantwort hat.

#### **6.5. Expression von *thpA*, *thpC* und *thpD* in *E. coli* M15 bzw. *Streptomyces lividans***

Enzymatische Arbeiten der Ectoin-Biosynthese sind von Ono *et al.* [1999] und Peters *et al.* [1990] durchgeführt worden. Dabei wurden unterschiedliche Substratspezifitäten bei den verschiedenen untersuchten Stämmen gefunden. So wurde als Substrat der N-Acetyl-DABA-Cyclase (THP(B)-Synthase) im Fall von *Halomonas elongata* OUT30018 die N- $\gamma$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure, im Gegensatz zur N- $\alpha$ -Acetyl-L-2,4-Diaminobuttersäure bei *Halomonas elongata* DSM 2581 und *Ectothiorhodospira halochloris* DSM1059, gefunden. Auch konnte die Reversibilität der Zyklisierung von N- $\alpha$ -Acetyl-Diaminobuttersäure durch die AcDABA-Cyclase (THP(B)-Synthase) bei *Halomonas elongata* OUT30018 nicht nachgewiesen werden.

Da es nicht gelang, *thpA*, *thpB* und *thpC* durch eine Insertionsmutagenese zu inaktivieren, wurde in dieser Arbeit zur Absicherung der Identität dieser Gene *thpA*, *thpC* und *thpD* in *E. coli* bzw. *Streptomyces lividans* exprimiert, um

anschließend die Genprodukte zu charakterisieren. Auf eine Expression von *thpB* (kodiert für die DABA-Aminotransferase) wurde verzichtet, da die DABA-Aminotransferase lediglich ein für die Substratbereitstellung (DABA) benötigtes Enzym ist und im Mechanismus der eigentlichen THP(A/B) Synthese keine Rolle spielt.

#### **6.5.1. Charakterisierung der rekombinanten DABA-Acetyltransferase (THPA)**

Die Expression von *thpA* (pQE30thpA) in *E. coli* führte zur Bildung einer Acetyltransferase, die eine Hexa-His-Sequenz am N-Terminus besitzt (Hexa-His-THPA-Fusionsprotein). Im SDS-Polyacrylamidgel konnte nach der Induktion die Bildung eines 21 kDa Proteins beobachtet werden. Es zeigte sich, daß das gesamte Hexa-His-THPA-Fusionsprotein löslich war und nach der Aufreinigung an einer Nickelchelat-Matrix in apparenter Homogenität vorlag. Durch die hohe Expressionsrate der pQE-Vektoren wurde mit rund 80 mg Fusionsprotein aus 2 g *E. coli* Zellen eine sehr hohe Ausbeute erzielt. Bei der Bestimmung der Aktivität zeigte sich, daß das Hexa-His-Fusionsprotein wie das Wildtypenzym aus *S. chrysomallus* die Bildung von N- $\gamma$ -Acetyl-Diaminobuttersäure ( $\gamma$ -AcDABA) aus L-2,4-Diaminobuttersäure und Acetyl-Coenzym A (AcCoA) katalysiert. Die spezifische Aktivität lag bei dem Hexa-His-THPA-Fusionsprotein um den Faktor 1000 höher als bei dem Wildtypenzym. Dies läßt sich zum einen dadurch erklären, daß das Wildtypenzym nicht homogen vorlag und zum anderen, daß die Aufreinigung des Hexa-His-THPA-Fusionsprotein in kürzerer Zeit durchgeführt werden konnte, so daß die Aktivitätsverluste sehr gering gehalten werden konnten.

Als Bestandteil des Zellwand-Peptidoglycans kommt DABA in vielen gram-positiven Bakterien vor [Perkins *et al.*, 1971; Suzuki *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996]. Darüber hinaus ist es in den Peptidantibiotika Colistin [Ito *et al.*, 1969] und Gavaserin [Pichard *et al.*, 1995] vorhanden. Freies im Cytoplasma vorliegendes DABA ist toxisch und konnte daher in Zellextrakten von *Halomonas elongata* OUT30018 nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte N- $\gamma$ -Acetyl-Diaminobuttersäure in einer Mutante von *Halomonas elongata* DSM 3043 [Cánovas *et al.*, 1998] und in *S. chrysomallus* [Keller und Lapidot, pers. Mitt.] nachgewiesen werden. Die Vorstufe von THP(B) N- $\gamma$ -Acetyl-

Diaminobuttersäure wirkt ebenfalls, wenn auch nicht im gleichen Maße wie THP(B) als Osmolyt.

Für die DABA-Acetyltransferase, die in der Biosynthese von THP(B) und THP(A) in *S. chrysomallus* involviert ist, konnten hier erstmals die kinetischen Parameter bestimmt werden. Dabei wurden für das Wildtyp THPA Enzym  $K_m$ -Werte von 2 mM für DABA und 0,05 mM für AcCoA gefunden. Bei dem Hexa-His-THPA-Fusionsprotein wurde für DABA ein vergleichbarer Wert mit 2,3 mM gefunden. Der  $K_m$ -Wert für AcCoA lag jedoch mit 0,18 mM über dem des Wildtypenzym. Als Ursache könnte die sich am N-Terminus befindliche Hexa-His-Sequenz sein. Bei der Substratspezifität des Hexa-His-THPA-Fusionsproteins wurde festgestellt, daß neben DABA auch eine Reihe weiterer Aminosäuren, wenn auch im geringeren Maße, acetyliert werden. So konnte bei den Diaminosäuren L-Lysin, L-Ornithin und L-2,3-Diaminopropionsäure die Bildung von zwei neuen Produkten nachgewiesen werden. Im Fall von L- $\beta$ -Lysin, wo sich eine Aminogruppe in  $\beta$ -Position befindet, bei der L- $\gamma$ -Aminobuttersäure und bei der L- $\epsilon$ -Aminocaprinsäure konnte jeweils ein Produkt nachgewiesen werden. Befindet sich nur eine Aminogruppe in der  $\beta$ -Position, wie bei der  $\beta$ -Aminobuttersäure, so findet keine Acetylierung statt. Bei dem gereinigten Wildtypenzym aus *S. chrysomallus* konnten diese Acetylierungen nicht beobachtet werden, was wahrscheinlich durch die viel zu geringe Menge des verfügbaren Enzyms, als im Vergleich zum rekombinanten Protein begründet ist. Interessanterweise besitzt *S. chrysomallus* jedoch weitere Enzyme, die L-Lysin und L-Ornithin sehr gut acetylieren können (unveröffentlicht).

### 6.5.2. Analyse von *thpD*

Das durch *thpD* kodierte Protein zeigte beim Vergleich mit Proteinsequenzen in Datenbanken Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ -Ketoglutarat abhängigen Hydroxylasen. Dabei handelte es sich um Dioxygenasen, die  $\alpha$ -Ketoglutarat und  $O_2$  als Cosubstrate und  $Fe^{2+}$  als Cofaktor für die Reaktion benötigen [Metcalf *et al.*, 1998]. Es wurde deshalb angenommen, daß dieses Protein die Bildung von THP(A) aus THP(B) katalysiert.

Die Expression von *thpD* in *E. coli* führte sowohl mit N-terminaler Hexa-His-Sequenz als auch ohne Hexa-His-Sequenz zur Bildung eines entsprechenden Proteins, wobei aber in beiden Fällen nur ein geringer Teil des exprimierten

Proteins löslich war. In beiden Fällen war das Enzym inaktiv, so daß die Bildung von THP(A) aus THP(B) nicht stattfand. Die Gründe hierfür könnten Fehlfaltungen des Proteins in *E. coli* sein. Im Gegensatz hierzu lieferte die Expression des mit einer Hexa-His-kodierenden Sequenz modifizierte *thpD* Gens in *S. lividans* ein natives Protein. Nach dessen Reinigung durch Affinitätschromatographie an Nickelchelate-Matrix konnte eine katalytische Aktivität in Bezug auf die Umsetzung von THP(B) zu THP(A) in Gegenwart von  $\alpha$ -Ketoglutarat,  $\text{FeSO}_4$  und L-Ascorbinsäure nachgewiesen werden. Im SDS-Polyacrylamidgel war eine Proteinbande im Größenbereich von 35 kDa zu erkennen, die zudem eine Immunreaktion mit dem PentaHis-Antikörper zeigte. Durch HPLC-Analyse mit authentischen THP(A) als Referenz konnte die Bildung von THP(A) nachgewiesen werden. Zusätzlich erfolgte die Identifizierung durch eine massenspektroskopische Analyse des Produkts. Die spezifische Aktivität betrug 1 nkat/mg. Die spezifischen Aktivitäten anderer Dioxygenasen liegen in einem weiten Bereich von 15 pkat/mg für die Prolin-4-Hydroxylase (involviert in der Etamycin Biosynthese aus *Streptomyces griseoviridus*), [Lawrence *et al.*, 1996] bis 29 nkat/mg für die Prolin-3-Hydroxylase, welche freies L-Prolin hydroxyliert [Mori *et al.*, 1997]. Für die katalytische Aktivität dieser Hydroxylasen wird  $\text{Fe}^{2+}$  als Cofaktor benötigt, das in Folge der Reaktion zu  $\text{Fe}^{4+}$  oxidiert wird. Eine Regeneration des Cofaktors *in vitro* wird durch die Zugabe von Ascorbinsäure erreicht. So wurde eine 4fache Stimulierung der Hydroxylierung von THP(B) in Gegenwart von 1 mM Ascorbinsäure erzielt als bei der Kontrolle ohne Ascorbinsäure. Dies stimmt mit den Beobachtungen bei anderen Hydroxylasen wie z.B. der L-Prolin-3-Hydroxylase aus *Streptomyces* sp. Stamm TH1 überein [Mori *et al.*, 1997].

Bei der Hydroxylierungsreaktion entsteht als Nebenprodukt  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Aus diesem Grunde wurden dem Reaktionsansatz zunehmende Mengen an Katalase zugesetzt. Dabei war zu beobachten, daß bei einer Konzentration von 6 mg/ml eine fast vollständige Hydroxylierung von THP(B) erzielt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Hydroxylasen berichtet [Mori *et al.*, 1997]. Die Messung der kinetischen Parameter der Hydroxylierungsreaktion ergaben einen  $K_m$ -Wert von 1,56 mM für THP(A) und einen von 0,26 mM für  $\alpha$ -Ketoglutarat. Die Stabilität des Hexa-His-THPD-Fusionsproteins aus *S. chrysomallus* war gering. So wurde nach einer

Lagerung von 16 Stunden bei 0°C nur noch 58% der ursprünglichen Aktivität festgestellt. Nach einer Präinkubation bei 30°C für vier Stunden wurde sogar nur noch eine Restaktivität von 24% und in Gegenwart von 10 mM THP(B) von 32% festgestellt. Eine Stabilisierung durch THP(B) selbst, das bekanntlicherweise Proteine stabilisiert, kann bei dieser geringen Konzentration prinzipiell ausgeschlossen werden. Die Abweichungen sind wahrscheinlich durch die Messung bedingt. All diese Ergebnisse zeigen, daß es in dieser Arbeit erstmalig gelungen ist, die *in vitro* Hydroxylierung von THP(B) zu THP(A) durchzuführen. Das durch *thpD* kodierte Enzym stellt somit die spezifische THP(B)-Hydroxylase dar und ist ein neues THP-Biosynthesenzym. Die Transkription des *thpD* Gens erfolgt wahrscheinlich als singuläres Transkript zusammen mit den anderen THP-Genen, da keine eindeutige Promotorsequenz vor dem *thpD*-Gen gefunden werden konnte. Jedoch sind zur eindeutigen Klärung dieses Sachverhaltes Promotor-Kartierungen in der Zukunft erforderlich.

### 6.5.3. Expression von *thpC* in *E. coli* M15 und *S. lividans*

Die Expression von *thpC* wurde in *E. coli* M15 sowohl mit als auch ohne Hexa-His-kodierende Sequenz durchgeführt. In beiden Fällen verhinderte die Unlöslichkeit des Proteins die Darstellung großer Mengen an aktivem Protein, zudem hatte der lösliche Restanteil keine enzymatische Aktivität. Als Substrat wurde zum einen chemisch synthetisiertes N- $\gamma$ -AcDABA und zum anderen N- $\gamma$ -AcDABA, das durch enzymatische Acetylierung von DABA mit Hilfe des rekombinanten Hexa-His-THPA-Fusionsproteins erhalten wurde, eingesetzt. Es konnte daher ausgeschlossen werden, daß ein falsches Substrat angeboten wurde.

Als Grund für den Aktivitätsverlust bei dem in *E. coli* gebildeten THPC-Enzym kann eine fehlerhafte Faltung angenommen werden, da derselbe Effekt schon bei dem THPD-Enzym beobachtet wurde. Aus diesem Grunde wurde wie bei *thpD* eine Expression von *thpC* als Hexa-His-Fusionsprotein in *S. lividans* durchgeführt. Bei der Chromatographie an der Nickelchelate-Matrix kam es in diesem Fall jedoch nicht zu einer Elution einer homogenen Proteinfraction, sondern zu einem heterogenen Gemisch vieler Proteine, welches die Zuordnung einer Bande auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu dem THPC-Fusionsprotein unmöglich machte. Die Immunoblotanalyse mit dem PentaHis-Antikörper der Firma Qiagen ergab keine immunpositive Bande. Interessanterweise konnte die

AcDABA-Cyclase-Aktivität aber sowohl in den Säulenfraktionen als auch im Durchfluß gefunden werden, die unabhängig von der Präsenz des Expressionsplasmids war und offensichtlich das Wildtypenzym von *Streptomyces lividans* war. Für die weitere Charakterisierung dieses Proteins wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes N- $\gamma$ -AcDABA (erhalten durch enzymatische Synthese) verwendet, und das daraus gebildete Produkt mit authentischen THP(B) in einer Reihe von Chromatographieschritten verglichen. Zusammen mit der anschließend durchgeführten Umsetzung des Produktes zu THP(A) zeigte, daß das Enzym die Bildung von THP(B) aus N- $\gamma$ -AcDABA eindeutig katalysiert. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem partiell gereinigten Enzym um die AcDABA-Cyclase handelt. Dies ist somit die erste enzymatische Totalsynthese von THP(A) (Hydroxyectoin) *in vitro*. Gleichzeitig kann 5-Hydroxy-N- $\gamma$ -Acetyl-2,4-Diaminobuttersäure als Vorstufe von THP(A) ausgeschlossen werden (siehe Abb. 4, Seite 10). Die Reversibilität der Zyklisierungsreaktion konnte wie bei *Halomonas elongata* DSM 2581 ebenfalls gezeigt werden [Peters *et al.*, 1990]. Dabei ist zu beachten, daß in beiden Fällen das Enzym nicht homogen vorlag, d.h. die Reversibilität der Zyklisierung könnte auch durch ein Begleitprotein verursacht worden sein. Bei dem von Ono *et al.* [1999] aus *Halomonas elongata* OUT30018 zur Homogenität gereinigten Enzym konnte keine Reversibilität der Zyklisierungsreaktion gefunden werden. Da es aber auch bezüglich des Substrates Unterschiede gab (N- $\alpha$ - /N- $\gamma$ -AcDABA), kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich auch die N-AcDABA zyklisierenden Eigenschaften, wie die Katalyse der Zyklisierungsrückreaktion unterscheiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das THP(A)-Gencluster aus *S. chrysomallus* kloniert wurde. Die verschiedenen Gene wurden durch Expression und Testung der betreffenden Enzyme funktionell zugeordnet, was jeden Zweifel an der Identität der Gene im Cluster ausschließt. Mit der Hilfe der rekombinant gebildeten Enzyme war die *in vitro* Totalsynthese von THP(A) (Hydroxyectoin) erstmals möglich, und es konnte damit die Biosynthese dieser Substanz aufgeklärt werden. Aufgrund der für Streptomyceten niedrigen G+C-Gehalte der Gene des THP(A)-Genclusters kann ein horizontaler Gentransfer aus anderen Organismen auf die Streptomyceten nicht ausgeschlossen werden.

Durch diese Ergebnisse wird die Analyse der Salzstressantwort in Streptomyceten in Zukunft ermöglicht.

## 7. Literatur

**Arakawa T, Timasheff SN** (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* Mar; **47(3)**:411-414.

**Bibb MJ, Findlay PR and Johnson MW** (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and his use for the single and reliable identification of protein-coding sequences; *Gene* **30**, 157-166.

**Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*; **7**:1513.

**Blackwell JR, Horgan R** (1991). A novel strategy for production of a highly expressed rekombinant protein in an active form; *FEBS* **295**:10-12.

**Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*; **72**, 248-254.

**Brown IR** (1990). Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events: a current perspective. *J Neurosci Res* Nov; **27(3)**:247-255.

**Canovas D, Vargas C, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Rhodes D, Ventosa A, Nieto JJ** (1997). Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem*; **272(41)**:25794-25801.

**Canovas D, Vargas C, Calderon MI, Ventosa A, Nieto JJ** (1998). Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol.*; **21(4)**:487-497.

**Chater KF and Merrick MJ** (1979). Streptomyces. p. 93-114. In Parish, J. H. (ed.), Developmental biology of prokaryotes. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**Chen EJ and Seeburg PH** (1985). Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA*; **4**:165-170.

**Collins, J., Groos, G. and Lindenmaier, W.** (1984). Recombinant DNA techniques. p. 87-132. In EMBO Practical course August 6th-18th, Copenhagen.

**Cohen S, Chang ACY, Hsu L** (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **69**:2110-2114.



- Crowe, JH, Chapenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ** (1990). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, **27**:219-231.
- Crowe, J. and Hence, K.** (1992). QIAexpress: The high level expression & protein purification system. *The QIAexpressionist* 2nd edition, Hilden and Chatsworth.
- Csonka LN** (1981). The role of proline in osmoregulation in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Basic Life Sci*; **18**:533-542.
- Csonka LN, Hanson AD** (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*; **45**:569-606.
- Cundliffe E** (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol*; **43**:207-233.
- Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R and Bakker EP** (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch Microbiol*; **150**:348-357.
- Ensign JC** (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev Microbiol*; **32**:185-219.
- Farwick M, Siewe RM, Kramer R** (1995). Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol Aug*; **177(16)**:4690-4695.
- Galinski EA, Pfeiffer HP, Truper HG** (1985). 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem*; **149(1)**:135-139.
- Giaever HM, Styrvold OB, Kaasen I, Strom AR** (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **170(6)**:2841-2849
- Gowrishankar J, Manna D** (1996). How is osmotic regulation of transcription of the *Escherichia coli* proU operon achieved? A review and a model. *Genetica*; **97(3)**:363-378.
- Gross R, Arico B, Rappuoli R** (1989). Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol*; **3(11)**:1661-1667.
- Hanahan D** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol*; **166**, 557-563.

**Hecker M, Schumann W, Volker U** (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*; **19(3)**:417-428.

**Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W** (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **173(24)**:7918-7924.

**Hengge-Aronis R** (1996). Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **21(5)**:887-893.

**Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G, Bremer E** (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*; **52(4)**:569-584.

**Hochuli E, Döbeli H and Schacher A** (1987). New metal chelate adsorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography*; **411**:177-184.

**Hohn, B. and Collins, J.** (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*; **11**:291-298.

**Hopwood DA., Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM and Schrempf H** (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.

**Hulton CS, Seirafi A, Hinton JC, Sidebotham JM, Waddell L, Pavitt GD, Owen-Hughes T, Spassky A, Buc H, Higgins CF** (1990). Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell*; **63(3)**:631-642.

**Inbar L, Lapidot A** (1988). Metabolic regulation in *Streptomyces parvulus* during actinomycin D synthesis, studied with <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled precursors by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy and by gas chromatography-mass spectrometry. *J Bacteriol*; **170(9)**:4055-4064.

**Inbar L, Lapidot A** (1988a). The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled L-glutamate and <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *J Biol Chem*; **263(31)**:16014-16022.

**Inbar L, Lapidot A** (1991). <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry studies of carbon metabolism in the actinomycin D producer *Streptomyces parvulus* by use of <sup>13</sup>C-labeled precursors. *J Bacteriol*; **173(24)**:7790-7801.

**Ito M, Aida K, and Uemura T** (1969). Studies on the bacterial formation of a peptide antibiotic, colistin. On the biosynthetic pathway of  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid and relationship between colistin formation and amino acids metabolism in *Bacillus colistinus* KOYAMA. *Agric. Biol. Chem.*; **33**:949-958.

**Jebbar M, Talibart R, Gloux K, Bernard T, Blanco C** (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Bacteriol*; **174**(15):5027-5035.

**Kaasen I, Falkenberg P, Styrvold OB, Strom AR** (1992). Molecular cloning and physical mapping of the otsBA genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: evidence that transcription is activated by katF. *J Bacteriol*; **174**(3):889-98.

**Kappes RM, Kempf B, Bremer E** (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *J Bacteriol*; **178**(17):5071-5079.

**Katz E, Thompson CJ and Hopwood DA** (1983). Cloning and Expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2703-2714.

**Keller, U., Krengel, U. and Haese, A.** (1985). Genetic analysis in *Streptomyces chrysomallus*. *J. Biol. Chem.* **131**, 1181-1191.

**Kempf B, Bremer E** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol*; **170**(5):319-330.

**Kempf B, Bremer E** (1995). OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*; **270**(28):16701-16713

**Kieser T, Hopwood DA, Wright HM, Thompson CJ** (1982). pIJ101, a multicopy broad-host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol Gen. Genet*; **185**:223-238.

**Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Venter JC, et al** (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*; **390**(6658):364-370.

**Korn-Wendisch F. and Kutzner HJ** (1992). The family Streptomycetaceae. In the Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifikation, Applications. (A. Balons, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer, eds. New York: Springer Verlag), pp. 921-995.

**Kuosmanen M, Poso H** (1985). Inhibition of the activity of restriction endonucleases by spermidine and spermine. *FEBS Lett*; **179(1)**:17-20.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**:680-685.

**Lamark T, Kaasen I, Eshoo MW, Falkenberg P, McDougall J, Strom AR** (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **5(5)**:1049-64.

**Lanyi JK** (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev*; **38(3)**:272-290.

**Lapidot A, Ben-Asher E, Eisenstein M** (1995). Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA in vitro. *FEBS Lett*; **367(1)**:33-38.

**Lawrence CC, Sobey WJ, Field RA, Baldwin JE, Schofield CJ** (1996). Purification and initial characterization of proline 4-hydroxylase from *Streptomyces griseoviridis* P8648: a 2-oxoacid, ferrous-dependent dioxygenase involved in etamycin biosynthesis. *Biochem J*; **313 (Pt 1)**:185-191.

**Le Rudulier D, Bouillard L** (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl Environ Microbiol*; **46(1)**:152-159.

**Lee YWW, Chou BF, Wu SY, Leu WM, Lin JJ, Chen CW and Lo SJ** (1988). A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase gene in *Streptomyces*. *Gene*; **65**:71-81.

**Lippert K and Galinski EA** (1992). Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol*; **37**:61-65.

**Louis P, Galinski EA** (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*; **143 (Pt 4)**:1141-1149.

**Lucht JM, Dersch P, Kempf B, Bremer E** (1994). Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled proU operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **269(9)**:6578-6588.

**Malin G, Iakobashvili R, Lapidot A** (1999). Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem*; **274(11)**:6920-6929.

**Malin G, Lapidot A** (1996). Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol*; **178**(2):385-395.

**Mead DA, Szczesna-Skoruopa E and Kemper B** (1988). Single stranded DNA blunt T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Engin*; **1**:67-74.

**Mehta PK, Hale TI, Christen P** (1993). Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem*; **214**:549-561.

**Mellies J, Wise A, Villarejo M** (1995). Two different *Escherichia coli* proP promoters respond to osmotic and growth phase signals. *J Bacteriol*; **177**(1):144-151.

**Min-Yu L, Ono H, Takano M** (1993). Gene cloning of ectoine synthase from *Halomonas* sp. *Annu. Rep. int. Cent. Coop. Res. Biotechnol. Jpn.* **16**:193-200.

**Moore, J., Engelberg, A. and Bairoch, A.** (1988). Using PC/GENE for protein and nucleic acid analysis. *BioTechniques* **6**, 566-572.

**Mori H, Shibasaki T, Yano K, Ozaki A** (1997). Purification and cloning of a proline 3-hydroxylase, a novel enzyme which hydroxylates free L-proline to cis-3-hydroxy-L-proline. *J Bacteriol*; **179**(18):5677-5683.

**Motitschke L., Driller H, Galinski E** (1995). Ectoine and ectoinederivates as moisturizing agents in cosmetic preparation. **DE1993004342560**.

**Nakashima K, Sugiura A, Momoi H, Mizuno T** (1992). Phosphotransfer signal transduction between two regulatory factors involved in the osmoregulated kdp operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **6**(13):1777-1784.

**Nicolas KB and Nicolas B Jr** (1997). GenDoc; a tool for editing and annotating mutiple sequence alignments.

**Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo A, Takano M, Murooka Y** (1999). Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic eubacterium, *Halomonas elongata*. *J Bacteriol.*; **181**(1):91-99.

**Pearson WR and Lipman DJ** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.

**Perkins HR** (1971). Homoserine and diaminobutyric acid in the mucopeptide-precursor-nucleotides and cell walls of some plant-pathogenic corynebacteria. *Biochem J*; **121**(3):417-423.

**Peter H, Weil B, Burkovski A, Kramer R, Morbach S** (1998). *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J Bacteriol*; **180**(22):6005-6012.

**Peter H, Burkovski A, Kramer R** (1998a). Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem*; **273**(5):2567-2574.

**Peters P., Galinski EA, Trüpper HG** (1990). The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol. Lett.*; **71**:157-162.

**Pichard B, Larue JP, Thouvenot D** (1995). Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol Lett*; **133**(3):215-218.

**Pingoud A, Urbanke C, Alves J, Ehbrecht HJ, Zabeau M, Gualerzi C** (1984). Effect of polyamines and basic proteins on cleavage of DNA by restriction endonucleases. *Biochemistry*; **23**(24):5697-5703.

**Pinner E, Padan E, Schuldiner S** (1992). Cloning, sequencing, and expression of the *nhaB* gene, encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; **267**(16): 11064-11068.

**Rajkumari K, Kusano S, Ishihama A, Mizuno T, Gowrishankar J** (1996). Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription in vitro from osmotically regulated P1 and P2 promoters of proU in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; **178**(14):4176-4181.

**Saier MH Jr** (1998). Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv Microb Physiol*; **40**:81-136.

**Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Smith S** (1981). Long-chain fatty acyl-S-4'-phosphopantetheine-fatty acid synthase thioester hydrolase from rat. *Meth Enzymol*; **71**:181-200

**Snape JR, Walkley NA, Morby AP, Nicklin S, White GF** (1997). Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Argrobacterium radiobacter*. *J Bacteriol*; **179**(24):7796-7802

**Schauwecker F, Pfennig F, Schroder W, Keller U** (1998). Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from *Streptomyces chrysomallus* and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II. *J Bacteriol*; **180(9)**:2468-2474.

**Schleicher&Schuell** (1995). Blotting, Hybridization & Detection: An S&S Laboratory Manual.

**Shibasaki T, Mori H, Ozaki A.** Cloning of the L-Proline 4-Hydroxylase Gene from *Dactylosporangium* sp. RH1 and Its Expression in *Escherichia coli*, unpublished.

**Serrano R** (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol*; **165**:1-52.

**Snape JR, Walkley NA, Morby AP, Nicklin S, White GF** (1997). Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*. *J Bacteriol*; **179(24)**:7796-7802.

**Stock JB, Stock AM, Mottonen JM** (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature*; **344(6265)**:395-400.

**Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM** (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev*; **53(4)**:450-490.

**Sugiura A, Nakashima K, Tanaka K, Mizuno T** (1992). Clarification of the structural and functional features of the osmoregulated kdp operon of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; **6(13)**:1769-1776.

**Suzuki K, Sasaki J, Uramoto M, Nakase T, Komagata K** (1996). *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int J Syst Bacteriol*; **46(1)**:88-93.

**Takeuchi M, Weiss N, Schumann P, Yokota A** (1996). *Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic gram-positive, nonsporulating rod with 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol*; **46(4)**:967-971.

**Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wroblewski H, Blanco C, Bernard T** (1994). Osmoadaptation in *rhizobia*: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol*; **176(17)**:5210-5217.

**Tanaka T, Yamamoto S, Moriya T, Taniguchi M, Hayashi H, Kagamiyama H, Oi S** (1994). Aspartate aminotransferase from a thermophilic formate-utilizing methanogen, *Methanobacterium thermoformicum* strain SF-4: relation to serine and phosphoserine aminotransferases, but not to the aspartate aminotransferase family. *J Biochem* (Tokyo); **115**(2):309-317.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

**Ventosa A, Nieto JJ, Oren A** (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*; **62**(2):504-544.

**Vreeland RH** (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol*; **14**(4):311-356.

**Walderhaug MO, Polarek JW, Voelkner P, Daniel JM, Hesse JE, Altendorf K, Epstein W** (1992). KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *J Bacteriol*; **174**(7):2152-2159.

**Wohlfarth A, Severin J, Galinski EA** (1990). The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae*. *J. Gen. Microbiol.*; **136**:705-712.

**Wright F and Bibb MJ** (1992). Codon usage in the G+C rich *Streptomyces* genome. *Gene*; **113**: 55-65.

**Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC 19 vectors. *Gene*; **33**:103-119.

**Yasuhiko Y, Yoshio K, Eiichiro K, Yasuhiro T, Seichi S** (1997). Production of L-amino acid by fermentation method using ectoine. **JP1996000083559**.

**Yasuhiro T, Mitsuo T, Hiroyuki Y, Kazuhiko Y** (1996). High-density culture. **JP8154670A**.



# Lebenslauf

## Personalien:

Name: Nicolas, Lucas Grammel  
Anschrift Haynauer Str. 20, 12249 Berlin  
Geburtsdatum 02.03.1971  
Geburtsort Berlin  
Eltern Jürgen Grammel und Eva-Maria Grammel, geb. Blume

## Schulbildung:

1977 - 1981 Ludwig-Bechstein-Grundschule, Berlin  
1981 - 1983 Grundschule am Königsgraben, Berlin  
1983 - 1990 Beethoven-Oberschule, Berlin  
Juni 1990 Abitur

## Berufsausbildung:

10/90 Immatrikulation an der TU-Berlin  
Studienfach: Chemie (Diplom)  
11/96 Abschluß als Dipl. Chemiker  
Diplomarbeit: *Enzymatische Untersuchungen der Biosynthese von Pt-Tripeptid (Bialaphos).*  
Technischen Universität  
Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie  
Fachgebiet Biochemie und Molekulare Biologie

## Berufstätigkeit

seit 11/96 wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Technischen Universität  
Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie  
Fachgebiet Biochemie und Molekulare Biologie  
12/96-11/99 Promotion  
Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. Ullrich Keller:  
*Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in Streptomyces chrysomallus.*

## Eigene Publikationen

**Grammel N., Schwartz D., Wohlleben W., Keller U. (1998).** Phosphinothricin-Tripeptide Synthetases from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochemistry* 1998;**37(6)**:1596-603

**Tudzynski P., Holter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. (1999).** Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol Gen Genet* 1999 ;**261(1)**:133-41

**Grammel N., Keller U. (1999).** Tetrahydropyrimidin-Dioxygenase-Gen sowie Verfahren zur enzymatischen *in vivo* und *in vitro* Produktion von hydroxylierten Tetrahydropyrimidinen. Deutsches Patent (eingereicht am 24.11.1999, Nr.19957470.7)

**Florian Schauwecker, Frank Pfennig, Nicolas Grammel and Ullrich Keller (1999).** Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl-peptides. (Zur Veröffentlichung eingereicht bei *Chemistry & Biology*)

**Grammel N., Schauwecker F. and Keller U. (1999).** Genetic and Biochemical Characterization of the THP-Synthesis in *Streptomyces chrysomallus*. (in Vorbereitung)

## Kongreßbeiträge

### Vorträge

**Nicolas Grammel, Ullrich Keller (1997).** Phosphinothricyl-tripeptide synthetases from *Streptomyces viridochromogenes*. VAAM-Workshop, Biologie der Aktinomyceten, Wuppertal.

**P. Tudzynski, K. Hölter, T. Correra, C. Arntz, Universität Münster; N. Grammel, U. Keller, TU Berlin (1999).** Genetik der Mutterkorn-alkaloidbiosynthese bei *Claviceps purpurea*: Identifizierung eines Gen-Clusters. DECHEMA-Jahrestagung '99 (17. Jahrestagung der Biotechnologen), Wiesbaden.

**N. Grammel, J. Demydchuk, U. Keller, K. Lambrecht, H.P. Saluz & H. Krügel (1999).**  $\beta$ -Lysine activation is carried out by a peptidesynthetase in the streptotricin biosynthesis in *Streptomyces noursei*. VAAM-Workshop, Biologie der Aktinomyceten, Dresden.

### **Posterbeiträge**

**Nicolas Grammel, B. Riederer, U. Keller (1996).** Enzymatic studies of the biosynthesis of Phosphinothricin-Tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes*. Symposium of the Special Research Group *Integrated Enzyme Systems*, Enzymology of Biosynthesis of Natural Products, Berlin

**Nicolas Grammel, B. Riederer, U. Keller (1996).** Enzymatic studies of the biosynthesis of Phosphinothricin-tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes*. VAAM-Workshop, Biologie der Aktinomyceten, Tübingen.

**Ullrich Keller, Bernd Walzel, Brigitte Riederer und Nicolas Grammel (1997).** Biosynthese der Peptidalkaloide des Mutterkorns. Chemie in Berlin und Potsdam, Freie Universität Berlin, Berlin.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Horst Kleinkauf und Herrn Prof. Dr. Johann Salnikow danke ich, daß sie mir die Möglichkeit gaben, meine Dissertation an der Technischen Universität Berlin, Max-Volmer-Institut, Fachgebiet Biochemie und Molekulare Biologie, durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Ullrich Keller für die interessante Themenstellung, seine hervorragende Betreuung und die hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Bei dem Team der „AG Keller“ (Herrn Dr. Florian Schauwecker, Herrn Dr. Frank Pfennig, Herrn Dr. Rico Berger und Herrn Gunnar Schröder) möchte ich mich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Hierbei verdient Florian für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und seine jederzeit vorhandene fachliche Diskussionsbereitschaft einen besonderen Dank.

Bei der Einführung in die Proteinchemie stand mir Frau Dr. Brigitte Riederer hilfreich zur Seite, wofür ich ihr danke.

Die FPLC-Anlage wurde mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe des Herrn Priv. Doz. Dr. Joachim Vater zur Verfügung gestellt. Hierfür und für die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bedanken. An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Sigrid Steller für die technische Einweisung.

Auch bei den Arbeitsgruppen von Herrn Priv. Doz. Dr. Rainer Zocher und Herrn Priv. Doz. Dr. Hans von Döhren bedanke ich mich für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Für die schnelle und hervorragende Sequenzierung von Peptiden und Proteinen danke ich Frau Gabriele Haeselbarth und für die ausgezeichneten fotografischen Arbeiten Frau E. Denaro.

Herrn Dr. Fred Rosche (Probiobrug, Halle) danke ich für die massenspektrometrische Untersuchung.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern, die den Grundstein für diese Arbeit gelegt haben.